

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DESARROLLO DE MICROESFERAS
BIODEGRADABLES DE ACICLOVIR PARA
ADMINISTRACIÓN INTRAOCULAR**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Concepción Martínez Sancho

Bajo la dirección de las Doctoras:

Sofía Negro Álvarez
Rocío Herrero Vanrell

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2513-9

INTRODUCCIÓN

El segmento posterior del ojo es una zona del organismo de difícil acceso. Las vías de administración de fármacos más utilizadas para el tratamiento de enfermedades que afectan a esta zona del ojo son cuatro: tópica, sistémica, periocular e intraocular^{1,2,3}.

Los fármacos administrados por vía tópica ocular se depositan sobre la superficie de la córnea o se introducen en el saco conjuntival, realizándose la penetración a través de la conjuntiva o de la córnea, considerándose esta última como la barrera efectiva para el acceso de la sustancia activa al interior del ojo. Además, el paso a través del humor acuoso y del cristalino conduce, en la mayoría de los casos, a niveles no terapéuticos del fármaco en el segmento posterior⁴.

Si se utiliza la vía sistémica, los principales obstáculos con los que se encuentra el fármaco en su acceso a la zona posterior son las barreras hematoacuosa y hematorretiniana. La administración de fármacos por esta vía requiere dosis elevadas para lograr niveles terapéuticos en el vítreo y retina, y además se asocia con efectos secundarios sistémicos importantes.

La administración por la vía periocular presenta también el obstáculo de la barrera hematoocular aunque requiere menos dosis de fármacos que la vía sistémica y a veces se consiguen niveles terapéuticos en el vítreo y retina con una

¹ **Geroski, D.H. y Edelhauser, H.F.** Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 961-964 (2000).

² **Velez, G. y Whitcup, S.M.** New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. *Br. J. Ophthalmol.* 83: 1225-1229 (1999).

³ **Schulman, J., Peyman, G.A., Liu, J., Scott, M. y Barber, J.C.** The intraocular penetration of acyclovir after subconjunctival administration. *Ophthalmic. Surg.*, 18: 111-114 (1987).

⁴ **Kitagawa, K., Fukuda, M. y Sasaki, K.** Intraocular penetration of topically administered acyclovir. *Lens Eye Toxic. Res.*, 6: 365-373 (1989).

menor incidencia de efectos adversos que los asociados a la administración sistémica⁵.

En cualquier caso, la escasa penetración de muchos fármacos en el ojo no sólo limita el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de enfermedades intraoculares, sino también los límites de aplicación de los mismos para no incurrir en efectos secundarios sistémicos no deseados⁶. Por ello y debido a la poca accesibilidad de algunos fármacos al vítreo por vías indirectas, se hace necesaria la administración intravítrea para el tratamiento efectivo de algunas enfermedades del segmento posterior⁷.

La **administración por vía tópica** ocular se limita, fundamentalmente, a las afecciones de la superficie ocular y a las del segmento anterior. En general, para la elección de la forma de administración por vía tópica más idónea en el tratamiento de enfermedades oculares⁸, es necesario considerar distintos factores⁹:

- Capacidad de penetración ocular de la sustancia activa.
- Concentración terapéutica del fármaco en el lugar de acción.
- Características farmacocinéticas de la molécula activa.
- Duración del efecto.
- Riesgos y contraindicaciones.

⁵ Schulman, J., Peyman, G.A., Fiscella, R., Greenberg, D., Horton, M.B. y de Miranda, P. Intraocular acyclovir levels after subconjunctival and topical administration. *Br. J. Ophthalmol.*, 70: 138-140 (1986).

⁶ Teich, S.A., Cheung, T.W. y Friedman, A.H. Systemic antiviral drugs used in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*, 37: 19-53 (1992).

⁷ Tojo, K.J. y Ohtori, A. Pharmacokinetic model of intravitreal drug injection. *Math. Biosci.*, 123: 59-75 (1994).

⁸ Fletcher, C.V. Treatment of herpesvirus infections in HIV-infected individuals. *Ann. Pharmacother.*, 26: 955-962 (1992).

⁹ McGhee, C.N.J. Pharmacokinetics of ophthalmic corticosteroids. *Br. J. Ophthalmol.*, 76: 681-684 (1992).

El problema fundamental que presenta esta vía es la baja penetración del fármaco, resultando en su mayoría ineficaz en el tratamiento de las patologías que afectan al segmento posterior del ojo. Las formas farmacéuticas convencionales utilizadas para la administración de fármacos destinados al tratamiento de patologías oculares generalmente son gotas oculares¹⁰ y pomadas^{11,12,13,14}. También se han desarrollado una serie de nuevas formas de dosificación que incluyen: la modificación del fármaco por medios químicos, la inclusión del fármaco en sistemas multiparticulares (liposomas, nanopartículas y micropartículas) o insertos que se depositan directamente en la superficie ocular¹⁵.

Los colirios y pomadas oftálmicas constituyen las formas farmacéuticas más utilizadas para el tratamiento de enfermedades oculares. La penetración del fármaco a partir de la forma farmacéutica depende de una serie de factores como son: propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa y de los excipientes, el pH, tonicidad y viscosidad de la formulación, así como las características de la zona de administración. Una vez administrada, la molécula activa tiene que atravesar la córnea para ejercer su efecto. La instilación de un colirio en el ojo puede provocar dolor, irritación, reflejo palpebral y lagrimeo. El incremento de la secreción lacrimal produce una reducción del tiempo de contacto del medicamento en el ojo. Esta rápida eliminación precorneal conduce a una baja biodisponibilidad de

¹⁰ Poirier, R.H., Kingham, J.D., de Miranda, P. y Annel, M. Intraocular antiviral penetration. *Arch. Ophthalmol.*, 100: 1964-1967 (1982).

¹¹ Bauer, D.J., Collins, P., Tucker, W.E. y Macklin, A.W. Treatment of experimental herpes simplex keratitis with acycloguanosine. *Br. J. Ophthalmol.*, 63: 429-435 (1979).

¹² Oosterhuis, J.A., Versteeg, J., Kruit, P.J. y Postma, B.H. Aciclovir treatment in experimental herpetic keratitis in rabbits. *Ophthalmic. Res.*, 12: 38-44 (1980).

¹³ Wilhelmus, K.R., Coster, D.J. y Jones, B.R. Acyclovir and debridement in the treatment of ulcerative herpetic keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 91: 323-327 (1981).

¹⁴ Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. y Collins, P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, 272: 583-585 (1978).

¹⁵ Langer, R. New methods of drug delivery. *Science*, 249: 1527-1533 (1990).

muchos fármacos y limita su efecto terapéutico¹⁶. Muchos fármacos cuando se administran por vía ocular se aplican a dosis elevadas con el fin de obtener concentraciones terapéuticas en el lugar de acción, provocando, como consecuencia, efectos secundarios tanto oculares como sistémicos¹⁷. Las pomadas oftálmicas aumentan el tiempo de contacto de la sustancia activa con la superficie ocular, minimizando la dilución por las lágrimas y resistiendo al drenaje nasolacrimal. El problema fundamental que presentan para el paciente es la aparición de visión borrosa recurriéndose, en la mayoría de los casos, a su aplicación nocturna.

La penetración ocular y duración de acción de los fármacos aplicados tópicamente se puede incrementar utilizando un vehículo apropiado¹⁸ o elaborando sistemas de liberación controlada del fármaco tales como geles, liposomas, nano- y micropartículas, lentes de contacto e insertos. También se puede conseguir una liberación controlada mediante la iontoforesis¹⁹.

Los geles preparados con polímeros hidrofílicos se utilizan normalmente en forma de gotas oculares viscosas. Empleando polímeros solubles en agua el tiempo de residencia corneal se puede prolongar y la biodisponibilidad del fármaco aumenta. La viscosidad del gel obtenido está condicionada por la naturaleza del polímero empleado, por su concentración y, en determinados casos, por el pH²⁰.

¹⁶ **Lee, V.H.L. y Robinson, J.R.** Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. *J. Pharm. Sci.*, 68: 673-684 (1979).

¹⁷ **Urtti, A.** Delivery of antiglaucoma drugs: Ocular vs systemic absorption. *J. Ocular Pharmacol.*, 10: 349-357 (1994).

¹⁸ **Chrai, S.S. y Robinson, J.R.** Ocular evaluation of methylcellulose vehicle in albino rabbit. *J. Pharm. Sci.*, 63: 1218-1223 (1974).

¹⁹ **Sarraf, D. y Lee, D.A.** The role of iontophoresis in ocular drug delivery. *J. Ocular Pharmacol.*, 10: 69-81 (1994).

²⁰ **Ludwig, A. y Van Ooteghem, M.** The evaluation of viscous ophthalmic vehicles by slit lamp fluorophotometry in humans. *Int. J. Pharm.*, 54: 95-102 (1989).

Los polímeros más utilizados para preparaciones oftálmicas tópicas son derivados semisintéticos de la celulosa^{21,22}, soluciones de polisacáridos semi-sintéticos o naturales como son el dextrano, xantano y goma gelan, polímeros sintéticos, principalmente polivinilalcohol^{23,24} y ácido poliacrílico y sus derivados. Estas soluciones poliméricas viscosas también se utilizan en otras preparaciones oftálmicas como las lágrimas artificiales y soluciones para lentes de contacto.

Más recientemente, otra estrategia para prolongar la residencia ocular se basa en la utilización de sistemas bioadhesivos, que incluyen polímeros capaces de adherirse a la superficie de las células y/o interactuar con la mucina que recubre el epitelio de la córnea, aumentando no sólo el tiempo sino también la intensidad del contacto entre las sustancias activas y la superficie ocular. Así, la prolongación del tiempo de retención en la superficie ocular por interacción con la mucina, se puede conseguir con la adición de sustancias mucoadhesivas como el ácido hialurónico^{25,26} o el ácido poliacrílico^{27,28}.

²¹ **Deshpande, S.G. y Shirolkar, S.** Sustained release ophthalmic formulations of pilocarpine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41: 197-200 (1998).

²² **Tous, S.S. y Abd-El Nasser, K.** Acetazolamide topical formulation and ocular effect. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 2: 125-131 (1992).

²³ **Bernatchez, S.F., Tabatabay, C. y Gurny, R.** Sodium hyaluronate at 0.25% used as vehicle increases the bioavailability of topically administered gentamicin. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 231: 157-171 (1993).

²⁴ **Davies, N.M., Farr, J., Hadgraft, J. y Kellaway, I.W.** Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Pharm. Res.*, 8: 1039-1043 (1991).

²⁵ **Saettone, M.F., Chenoti, P., Torracca, M.T., Bungalassi, S. y Giannaccini, B.** Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *Int. J. Pharm.*, 51: 203-212 (1989).

²⁶ **Gurny, R., Riser, J.E., Tabatabay, G., Martenet, M., Edman, P. y Camber, O.** Precorneal residence time in humans of sodium hyaluronate as measured by gamma-scintigraphy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 228: 510-512 (1990).

²⁷ **Unlu, N., Ludwig, A., Van Oosteghem, M. y Hincal, A.** Formulation of Carbopol 940 ophthalmic vehicles and in vitro evaluation of the influence of simulated lachrymal fluid on their physicochemical properties. *Pharmazie*, 46: 748-788 (1991).

²⁸ **Herrero-Vanrell, R., Fernández-Carballido, A., Frutos, G. y Cadórniga, R.** Enhancement of the mydriatic response of tropicamide by bioadhesive polymers. *J. Ocular Pharm. Therapeutic.*, 16: 419-428 (2000).

Los hidrogeles son dispersiones de polímeros o copolímeros hidrofílicos que, en determinadas condiciones, se reorganizan espacialmente dando como resultado una estructura tridimensional capaz de inmovilizar grandes cantidades de agua o soluciones acuosas^{29,30}.

Los hidrogeles se pueden clasificar en hidrogeles preformados y los formados *in situ*. Los hidrogeles preformados son soluciones viscosas que no sufren modificaciones tras la administración, mientras que los geles formados *in situ* son formulaciones que se aplican como soluciones y que gelifican tras su instilación, al ponerse en contacto con la superficie ocular³¹. Entre los polímeros utilizados para elaborar hidrogeles preformados podemos destacar los derivados celulósicos, el polivinilalcohol, los carbómeros, el ácido hialurónico y el quitosano. Los hidrogeles preformados presentan una serie de inconvenientes que limitan el interés de su uso como sistemas de liberación de fármacos por vía oftálmica. Así, cabe destacar la dificultad para lograr una dosificación exacta y reproducible, producir visión borrosa tras la instilación e incrementar el reflejo del lagrimeo. Los geles formados *in situ* son dispersiones poliméricas líquidas capaces de gelificar en contacto con los tejidos oculares. El cambio de fase de líquido a semisólido puede ser provocado por un aumento de temperatura (hidrogeles termosensibles), un cambio de pH o también por la fuerza iónica de la película lacrimal (geles inducidos por iones o goma gelan). Entre los polímeros más utilizados en oftalmología con estos fines se encuentran los poloxameros³² y el Gelrite®³³.

²⁹ Sintzel, M., Bernatchez, S., Tabatabay, C. y Gurny, R. Biomaterials in ophthalmic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42: 358-374 (1996).

³⁰ Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W. y Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50: 27-46 (2000).

³¹ Buri, P. y Gurtler, F. Les formes ophtalmiques à action prolongée. *Les préparations ophtalmiques*. Buri, P. (ed.), Lavoisier, Paris, 127-215 (1995).

³² Miller, S.C. y Donovan, M.D. Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 12: 147-152 (1982).

³³ Rozier, A., Mazuel, C., Grove, J. y Plazonnet, B. Gelrite: A novel, ion-activated, in situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect of bioavailability of timolol. *Int. J. Pharm.*, 57: 163-168 (1989).

Los liposomas son estructuras vesiculares constituidas por una o más bicapas lipídicas que encierran un número igual de compartimentos acuosos. Estas capas lipídicas están formadas principalmente por fosfolípidos y colesterol. Se pueden distinguir distintos tipos de liposomas según su tamaño y número de bicapas de fosfolípidos que forman la pared: liposomas multilaminares (MLV), liposomas unilaminares de tamaño pequeño (SUV) y liposomas unilaminares de gran tamaño (LUV). Según su composición los liposomas pueden tener carga superficial positiva, negativa o neutra. Las moléculas activas se incorporan en función de su solubilidad, bien en la membrana lipídica, en el compartimento acuoso o entre ambos.

Los primeros autores en evaluar el potencial de los liposomas en la terapia oftálmica fueron Smolin y col.³⁴ Estos autores demostraron que la idoxuridina encapsulada en liposomas es más efectiva que la molécula libre en el tratamiento de estados agudos y crónicos de la queratitis herpética. Además, observaron no solamente un aumento de la penetración corneal de la idoxuridina, sino también una mayor afinidad de la molécula activa por las células infectadas por el virus del herpes. De hecho, los buenos resultados obtenidos por estos autores han llevado a otros investigadores a explorar el potencial de los liposomas en el campo de la oftalmología^{35,36,37}.

La eficacia de los liposomas en la terapia oftálmica depende de una serie de factores entre los que se incluyen³⁸: la eficiencia de encapsulación del fármaco,

³⁴ **Smolin, G., Okumoto, M., Feiler, S. y Condon, D.** Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 91: 220-225 (1981).

³⁵ **Schaeffer, H.E. y Krohn, D.L.** Liposomes in topical drug delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 22: 220-227 (1982).

³⁶ **Tall, A.R., Hogan, V., Askinazi, L. y Small, D.M.** Interaction of plasma high-density lipoproteins with dimyristoyllecithin multilamellar liposomes. *Biochemistry*, 17: 322-326 (1978).

³⁷ **Stratford, H.E., Yang, D.C., Redell, M.A. y Lee, V.H.L.** Ocular distribution of liposome-encapsulated epinephrine and inulin in the albino rabbit. *Curr. Eye Res.*, 2: 377-386 (1982).

³⁸ **Lee, V.H.L., Urrea, T., Smith, R.E. y Schanzlin, D.J.** Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. *Surv. Ophthalmol.*, 29: 335-348 (1985).

el tamaño y la carga de las vesículas, la distribución del fármaco en los liposomas, la estabilidad de los liposomas tras la instilación, el tiempo de permanencia de los mismos en el saco conjuntival, y por último, su afinidad por la córnea.

Numerosos fármacos han sido objeto de incorporación en liposomas en preparados oftálmicos para administración por vía oftálmica, y dentro del grupo de los antivirales se encuentran el aciclovir^{39,40,41,42} y la idoxuridina^{43,44}.

Las nanopartículas han destacado como sistemas de liberación controlada en los últimos años. Son sistemas coloidales de naturaleza polimérica, cuyo tamaño oscila entre 10 y 1000 nm⁴⁵. Atendiendo a su estructura éstos pueden ser: nanosferas (sistemas matriciales en los que la sustancia activa se encuentra dispersa de forma uniforme y/o disuelta en un entramado polimérico) y nanocápsulas (partículas sólidas con un núcleo sólido, líquido o semisólido rodeado por una membrana de naturaleza polimérica, formando un sistema reservorio). Ambos sistemas pueden llevar adsorbido el fármaco en su superficie y permiten la vehiculización de sustancias activas de diversa naturaleza, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, presentando una buena estabilidad *in vitro* e *in vivo*. La utilidad de las

³⁹ Law, S.L., Huang, K.J. y Chiang, C.H. Acyclovir containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J. Control. Release*, 63: 135-140 (2000).

⁴⁰ Fresta, M., Panico, A.M., Bucolo, C., Giannavola, C. y Puglisi, G. Characterisation and in vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 565-576 (1999).

⁴¹ Norley, S.G., Sendele, D., Huang, L. y Rouse, B.T. Inhibition of herpes simplex virus replication in the mouse cornea by drug containing immunoliposomes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28: 591-595 (1987).

⁴² Peyman, G.A., Charles, H.C., Liu, K.R., Khoobehi, B. y Niesman, M. Intravitreal liposome-encapsulated drugs: A preliminary human report. *Int. Ophthalmol.*, 12: 175-182 (1988).

⁴³ Dharma, S.K., Fishman, P.H. y Peyman, G.A. A preliminary study of corneal penetration of 125-labeled idoxuridine liposome. *Acta Ophthalmol.*, 64: 298-301 (1986).

⁴⁴ Smolin, G., Okumoto, M., Feiler, S. y Condon, D. Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 91: 220-225 (1981).

⁴⁵ Kreuter, J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: preparation methods. *Pharm. Acta Helv.*, 58: 217-226 (1983).

nanopartículas en la terapia ocular ha sido demostrada en numerosos estudios^{46,47,48}. Los polímeros más comúnmente utilizados en la preparación de nanopartículas para uso oftálmico son polialquilcianoacrilatos, policaprolactonas o copolímeros del ácido láctico-glicólico.

Las micropartículas poseen un tamaño comprendido entre 1-1000 μm , aunque algunos autores han fijado los límites entre 0,5 μm y 5000 μm ⁴⁹. Al igual que ocurre con las nanopartículas, entre las micropartículas se pueden diferenciar, aquellas cuya estructura está formada por una cubierta externa que rodea a un núcleo líquido o sólido, denominadas microcápsulas^{50,51,52}, y aquellas cuya estructura consiste en una matriz polimérica en la que se aloja la sustancia activa en forma de dispersión molecular o suspensión, las microesferas⁵³. El desarrollo de micropartículas surge ante la necesidad de conseguir una cesión controlada de la molécula activa, una administración más sencilla que conlleve el menor riesgo posible para el paciente, una disminución de efectos adversos y que el tratamiento pueda realizarse en administración única o sino, con dosis espaciadas en el tiempo. En este sentido, Genta y cols. elaboraron microesferas bioadhesivas de aciclovir

⁴⁶ Wood, R.W., Lee, V.H.L., Kreuter, J. y Robinson, J.R. Ocular disposition of poly-hexyl-2-cyano(3-14C) acrylate nanoparticles in the albino rabbit. *Int. J. Pharm.*, 23: 175-183 (1985).

⁴⁷ Losa, C., Marchal-Heussler, L., Orallo, F., Vila-Jato, J.L. y Alonso, M.J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metaprolol. *Pharm. Res.*, 10: 80-87 (1993).

⁴⁸ Barbault-Foucher, S., Gref, R., Russo, P. y Bochot, A. Design of poly- ϵ -caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. *J. Control. Release*, 83: 365-375 (2002).

⁴⁹ García-Encina, G., Seijo, B., Vila-Jato, J.L. y Torres, D. Microcápsulas en tecnología farmacéutica. *Ind. Farm.*, Mayo-Junio: 33-42 (1993).

⁵⁰ Maulding, H.V. Prolonged delivery of peptides by microcapsules. *J. Control. Release*, 6: 167-176 (1987).

⁵¹ Atkins, T.W. y Peacock, S.J. The incorporation and release of bovine serum albumin from poly-hydroxybutyrate-hydroxivalerate microcapsules. *J. Microencapsul.*, 13: 709-717 (1996).

⁵² Gürsel, I. y Hasirci, V. Properties and drug release behaviour of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate) copolymer microcapsules. *J. Microencapsul.*, 12: 185-193 (1995).

⁵³ Tice, T.R., Mason, D.W. y Gilley, R.M. Clinical use and future of parenteral microsphere delivery systems. *Novel Drug Delivery*. Prescott, L.F. y Nimmo, W.S. (ed.), New York, 223-235 (1989).

para administración tópica capaces de promover la liberación prolongada del fármaco y aumentar la biodisponibilidad ocular del aciclovir⁵⁴.

Previamente se ha indicado que en el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo se puede recurrir a la administración de fármacos por **vía sistémica**. Así, entre las patologías que habitualmente son tratadas con fármacos por esta vía destacan las enfermedades oclusivas de los vasos retinianos y aquellas que cursan con infección y/o inflamación de la zona como son⁵⁵:

- El edema macular cistoide, que aparece como consecuencia de una acumulación de fluido intrarretinal y cuyo tratamiento consiste en la administración de acetazolamida por vía sistémica.
- La toxoplasmosis ocular, enfermedad producida por el parásito protozoario intracelular *Toxoplasma gondii*, y que es una de las causas principales de la aparición de uveitis posterior. El tratamiento incluye la administración sistémica de agentes antitoxoplásmicos (pirimetamina y clindamicina) junto con esteroides por vía oral y sulfonamidas.
- La retinitis por citomegalovirus, asociada con el síndrome de inmunodeficiencia humana, es la enfermedad ocular más habitual y grave en enfermos con SIDA. Esta patología cursa con una infección necrosante que provoca la destrucción total de la retina. Los fármacos de elección para el tratamiento de esta enfermedad son el ganciclovir y foscarnet.

⁵⁴ **Genta, I., Conti, B., Perugini, P., Pavanetto, F., Spadaro, A. y Puglisi, G.** Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49: 737-742 (1997).

⁵⁵ **Alexander, L.D.** Diseases of the retina. *Clinical Ocular Pharmacology*, 3ª edición. Barlett, J.D. y Jaanus, S.D. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 809-839 (1995).

- El síndrome de necrosis retiniana aguda es una variación de la vasculitis retiniana oclusiva que afecta a las arterias de la retina y coroides, y que aparece normalmente en enfermos inmunodeprimidos. Los agentes causales son los virus del herpes. Las infecciones por virus del herpes simple se asocian a enfermos jóvenes, mientras que las debidas al virus del herpes zoster aparecen en la población de mayor edad. La administración de aciclovir 3 veces al día por vía intravenosa durante 5-10 días seguida de aciclovir oral 5 veces al día durante 6 semanas es el tratamiento más recomendado. La incorporación al tratamiento de corticosteroides por vía sistémica puede suprimir los efectos inflamatorios asociados a esta patología, sin embargo tienen la desventaja de ser susceptibles de exacerbar la infección viral.

De acuerdo con diversos autores, la administración de fármacos por la **vía periocular** incluye: la vía subconjuntival, bajo la cápsula de Tenon, la vía retrobulbar y la vía peribulbar⁵⁶.

Aunque la administración por la vía subconjuntival permite alcanzar concentraciones de fármaco en los tejidos superiores a los conseguidos por vía sistémica, no está exenta de efectos secundarios. Las principales desventajas de las inyecciones subconjuntivales son la aparición de hemorragias subconjuntivales masivas, ojos irritados, dolor y depósitos de fármaco retenido en esta zona. En la actualidad se está ensayando la administración por esta vía de sistemas de liberación controlada, nano- y micropartículas, con el objeto de alcanzar niveles de fármaco que resulten terapéuticos en la retina⁵⁷.

La administración bajo la cápsula de Tenon no presenta ventajas significativas sobre la subconjuntival debido al mayor riesgo de perforación

⁵⁶ **Barlett, J.D.** Ophthalmic Drug Delivery. *Clinical Ocular Pharmacology*, 3ª edición. Barlett, J.D. y Jaanus, S.D. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 47-74 (1995).

⁵⁷ **Kompella, U.B., Bandi, N. y Ayalaomayajula, S.P.** Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 1192-1201 (2003).

accidental del globo ocular, si bien ocasionalmente se puede utilizar en el tratamiento de uveitis agudas, así como en el tratamiento del edema macular cistoide.

La inyección retrobulbar resulta de gran interés para lograr un estado de anestesia en determinadas cirugías intraoculares. Se utiliza para la administración de fármacos como antibióticos, corticosteroides, vasodilatadores y alcohol para anestesia.

La ventaja fundamental de la administración peribulbar frente a la retrobulbar consiste en reducir el riesgo de hemorragia retrobulbar, así como disminuir la incidencia de lesiones del nervio óptico y de perforaciones del globo ocular.

Las complicaciones y desventajas asociadas a la administración de fármacos por la vía periocular limita su uso a enfermedades que no responden al tratamiento por vía tópica.

La **administración intraocular** de fármacos es la vía más utilizada para el tratamiento local de afecciones del segmento posterior que comprometen la visión. Generalmente se recurre a este tipo de administración cuando se han agotado otras vías menos agresivas o en aquellos casos en los que la severidad de la patología lo exige. Las afecciones oculares susceptibles de requerir una administración intravítrea son aquellas que afectan fundamentalmente al vítreo y la retina. Dichas patologías vitreoretinianas son una de las causas más frecuente de ceguera en los países desarrollados. Entre estas patologías destacan la uveítis, endoftalmitis fúngicas y bacterianas, vitreoretinopatía proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, procesos infecciosos causados por virus del herpes

(necrosis retiniana aguda progresiva, retinitis por citomegalovirus, etc.), retinopatía diabética, melanomas y retinitis pigmentosa^{58,59,60,61,62}.

En términos generales, el vítreo es un cuerpo gelatinoso, transparente y avascular que ocupa el 65% del volumen del ojo (3,9 ml) y ocupa el espacio limitado por el cristalino, la retina y el disco óptico. Está constituido por un 99% de agua y el 1% restante lo componen colágeno y ácido hialurónico, que le confieren una estructura y consistencia similar a la de un hidrogel⁶³. Su pH está comprendido entre 7,2 y 7,5⁶⁴.

Los preparados que permiten la administración de fármacos por vía intravítrea incluyen: los sustitutos del vítreo, las soluciones, los preparados “depot”, los implantes y los sistemas multiparticulares.

Los sustitutos del vítreo permiten la incorporación de fármacos tanto lipofílicos en aceite de silicona⁶⁵ como hidrofílicos en ácido hialurónico⁶⁶ y derivados celulósicos.

⁵⁸ **Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y. y Ogura, Y.** Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 52: 25-36 (2001).

⁵⁹ **Meyers, S.M. y Rodrigues, M.M.** Effect of selected intravitreal drugs after severe penetrating injury in rabbits. *Curr. Eye Res.*, 1: 471-477 (1981).

⁶⁰ **Tano, Y., Sugita, G. y Abrams, G.** Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am. J. Ophthalmol.*, 89: 131-136 (1980).

⁶¹ **Park, S.S., Samly, N., Ruoff, K., D'Amico, D.J. y Baker, A.S.** Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch. Ophthalmol.*, 113: 1324-1329 (1995).

⁶² **Petrovich, M., Ferreira, M., Alfaro, V., Lee, M., Trousdale, M. y Liggett, P.** Intravitreal acyclovir clearance in rabbits with experimentally induced herpes simplex virus retinitis. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 180: 727 (1992).

⁶³ **Vaughan, D., Asbury, T. y Riordan-Eva, P.** Anatomía y embriología del ojo. *Oftalmología General*, 13ª edición. Manual Moderno, México D.F., 1-25 (1994).

⁶⁴ **Geigy Scientific Tables.** Vol. 1. 8ª edición. Lentner, C. (ed.), Ciba-Geigy Limited, Basel, 178-180 (1984).

⁶⁵ **Araiz, J.J., Refojo, M.F., Arroyo, M.H., Leong, D.F.L., Albert, D.M. y Tolentino, F.I.** Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34: 522-530 (1993).

⁶⁶ **Bernatchez, S.F., Camber, O., Tabatabay, C. y Gurny, R.** Use of hyaluronic acid in ocular therapy. *Biopharmaceutics of ocular drug delivery*. CRC Press Inc., Boca Raton, 105-121 (1993).

Con la administración intravítrea de soluciones de fármacos se consiguen niveles superiores de sustancia activa en el lugar de acción y se disminuyen por un lado, los efectos secundarios derivados de la administración por vía sistémica como puede ser el riesgo de sepsis por el mantenimiento permanente de un catéter en vena y se evitan, por otro, el efecto selectivo a la penetración del fármaco que ejercen tanto la córnea como el cristalino, en función de su estado y de las características de la sustancia activa⁶⁷, así como las interacciones medicamentosas con otros tratamientos derivadas de la vía tópica ocular. Sin embargo, el inconveniente fundamental de esta administración se presenta en aquellas situaciones que requieren de tratamientos prolongados, en los cuales es necesaria la administración repetida de inyecciones intravítreas para mantener las concentraciones del fármaco dentro de la ventana terapéutica, durante un periodo de tiempo prolongado. Los efectos adversos que aparecen con más frecuencia son atrofia óptica, cataratas, hemorragia vítrea, desprendimiento de retina y endoftalmitis que aumentan con la frecuencia de las inyecciones. Además, el bajo índice terapéutico de algunos fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades del segmento posterior puede dar lugar a concentraciones que resultan tóxicas para la retina^{68,69}. Estos hechos han fundamentado el interés en el desarrollo de sistemas capaces de ceder el fármaco durante un periodo de tiempo prolongado.

Entre los sistemas de acción prolongada para administración intraocular se incluyen los preparados “depot”. Dentro de éstos destacan las formulaciones con acetónido de fluocinolona⁷⁰ y de triamcinolona utilizadas para el tratamiento de inflamaciones intraoculares y del edema macular cistoide, las cuales se tratan con

⁶⁷ **Peyman, G.A. y Schulman, A.** Intravitreal drug therapy. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 33: 392-404 (1989).

⁶⁸ **Pulido, J.S., Palacio, M., Peyman, G.A., Fiscella, R., Greenberg, D. y Stelmack, T.** Toxicity of intravitreal antiviral drugs. *Ophthalm. Surg.*, 15: 666-669 (1984).

⁶⁹ **Small, G.H., Peyman, G.A., Srinivasan, A., Smith, T.S. y Fiscella, R.** Retinal toxicity of combination antiviral drugs in an animal model. *Can. J. Ophthalmol.*, 22: 300-303 (1987).

⁷⁰ **Jaffe, G.J., Yang, C.H., Guo, H., Denny, J.P., Lima, C. y Ashton, P.** Safety and pharmacokinetics of an intraocular fluocinolone acetonide sustained delivery device. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 3569-3575 (2000).

bastante frecuencia con inyecciones repetidas de corticosteroides. Dichos preparados, al presentar una lenta velocidad de disolución, permiten espaciar las administraciones⁷¹.

El desarrollo de formulaciones que permitan la liberación del fármaco de forma controlada, y además estén adaptadas a la vía intraocular, resulta de gran utilidad, ya que con una sola administración se podría lograr el mismo efecto que el conseguido al administrar el fármaco en dosis múltiples. Durante las últimas décadas el estudio de nuevas formulaciones para el tratamiento de patologías del segmento posterior ha sido objeto de numerosos estudios. Así, se emplean con este fin distintos sistemas farmacéuticos y dispositivos que se preparan a partir de polímeros biocompatibles biodegradables y no biodegradables. La preparación de los mismos utilizando polímeros biodegradables resultan idóneos, ya que permiten conseguir una cesión controlada del fármaco desapareciendo del lugar de acción una vez ejercido el efecto.

Los implantes intravítreos son capaces de liberar cantidades controladas de fármaco durante meses, por lo que resultan útiles en pacientes que requieren una terapia prolongada en enfermedades oculares crónicas. De hecho, los implantes intravítreos comercializados hasta el momento, son no biodegradables. Los polímeros más comúnmente utilizados para su preparación son: silicona, alcohol polivinílico y acetato de etilvinilo⁷². La elaboración de estos dispositivos incluye el recubrimiento de la molécula activa con mezclas de polímeros formando una serie de capas. De esta forma, controlando la composición de las láminas se modula la velocidad de cesión del fármaco a partir del sistema reservorio. Su implantación intravítrea requiere una incisión quirúrgica cuyas dimensiones oscilan entre 3 y 3,5 mm. Entre los fármacos utilizados en este tipo de implantes se encuentran el

⁷¹ Antcliff, R.J., Spalton, D.J., Stanford, M.R., Graham, E.M., Ffytche, T.J. y Marshall, J. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema. An optical coherence tomography study. *Ophthalmology*, 108: 765-772 (2001).

⁷² Ross, M.L., Yuan, P. y Robinson, M.R. Intraocular drug delivery implants. *Rev. Ophthalmol.*, 95-99 (2000).

ganciclovir^{73,74}, dexametasona⁷⁵, ciclosporina A⁷⁶ y combinaciones de corticosteroides con fluorouracilo⁷⁷. La principal desventaja de estos dispositivos es la incisión quirúrgica que hay que realizar para retirar o implantar un nuevo dispositivo⁷⁸. Los efectos adversos más frecuentes son: endoftalmitis bacteriana, hemorragias intravítreas, desprendimiento de retina y desplazamientos del sistema. Además, algunos investigadores han indicado la dificultad de realizar la sustitución debido a la aparición de fibrosis y necrosis.

Los sistemas biodegradables resultan particularmente interesantes, ya que desaparecen del lugar de acción una vez ejercido el efecto, evitando además los riesgos asociados a la implantación quirúrgica de los implantes no biodegradables.

Recientemente se han desarrollado los dispositivos biodegradables destinados a su implantación en la esclera, encontrándose aún en fase de investigación en modelos animales. El polímero utilizado en su preparación es el copolímero derivado de los ácidos láctico y glicólico (PLAGA)⁷⁹.

El desarrollo de sistemas multiparticulares que permitan la liberación controlada del fármaco y además estén adaptados a la vía intraocular también

⁷³ Sanborn, G.E., Anand, R., Torti, R.E., Nightingale, S.D., Cal, S.X., Yates, B., Ashton, P. y Smith, T.J. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. *Arch. Ophthalmol.*, 110: 188-195 (1992).

⁷⁴ Musch, D.C., Martin, D.F., Gordon, J.F., Davis, M.D. y Kuppermann, B.D. Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained-release ganciclovir implant. *N. Engl. J. Med.*, 337: 83-90 (1997).

⁷⁵ Cheng, C.K., Berger, A.S., Pearson, P.A., Ashton, P. y Jaffe, G.F. Intravitreal sustained-release dexamethasone device in the treatment of experimental uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 442-453 (1995).

⁷⁶ Jaffe, G.J., Yang, C.H., Wang, X.C., Cousins, S.W., Gallemore, R.P. y Ashton, P. Intravitreal sustained-release cyclosporine in the treatment of experimental uveitis. *Ophthalmology*, 105: 46-56 (1998).

⁷⁷ Berger, A.S., Cheng, C.K., Pearson, P.A., Ashton, P., Crooks, P.A., Cynkowski, T., Cykowska, G. y Jaffe, G.J. Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluoruracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37: 2318-2325 (1996).

⁷⁸ Morley, M.G., Duker, J.S., Ashton, P. y Robinson, M.R. Replacing ganciclovir implants. *Ophthalmology*, 102: 388-392 (1995).

⁷⁹ Okabe, J., Kimura, H., Kunou, N., Kato, A. y Ogura, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 4: 740-744 (2003).

resultan de gran utilidad, ya que con una administración única del preparado se podría lograr el mismo efecto que el conseguido al administrar el fármaco en dosis múltiples.

Entre estos últimos sistemas se incluyen los liposomas, las nano- y micropartículas. Experimentalmente se han diseñado liposomas de ganciclovir, foscarnet y cidofovir para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus, de aciclovir para el tratamiento de la necrosis retiniana aguda y de anfotericina B para el tratamiento de la endoftalmitis⁸⁰. Estos sistemas cuando incorporan ganciclovir o cidofovir son capaces de mantener niveles terapéuticos, en un modelo animal, durante 10-18 días y 8 meses, respectivamente. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que quedan suspendidos en el vítreo, con la consiguiente disminución en la transparencia vítrea necesaria para una visión óptima.

La formulación de nano- y micropartículas elaboradas a partir de polímeros biodegradables para administración intravítrea ha sido objeto de numerosos estudios. En el momento actual, uno de los objetivos del empleo de nanopartículas es lograr una localización específica del fármaco en la retina y el epitelio pigmentario retiniano⁸¹. A su vez, en las microesferas se ha incorporado un amplio grupo de moléculas activas para su administración intravítrea, entre los que se encuentran el ganciclovir⁸², ácido retinoico⁸³, adriamicina⁸⁴, fluoroura-

⁸⁰ Cannon, J.P., Fiscella, R., Pattharachayakul, S., Garey, K.W., De Alba, F., Piscitelli, S., Edward, D.P. y Danziger, L.H. Comparative toxicity and concentrations of intravitreal amphotericin B formulations in a rabbit model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 2112-2117 (2003).

⁸¹ Bourges, J.L., Gautier, S.E., Delie, F., Bejjari, R.A., Jeanny, J.C., Gurny, R., BenEzra, D. y Behar-Cohen, F.F. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 3562-3569 (2003).

⁸² Veloso, A.A., Zhu, Q., Herrero-Vanrell, R. y Refojo, M.F. Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 665-675 (1997).

⁸³ Giordano, G.G., Refojo, M.F. y Arroyo, M.H. Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34: 2743-2751 (1993).

⁸⁴ Moritera, T., Ogura, Y., Yoshimura, N., Honda, Y., Wada, R., Hyon, S.H. y Ikada, Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 1325-1330 (1992).

uracilo^{85,86,87} y fluoresceína sódica⁸⁸. La ventaja de estas formulaciones es que su administración resulta más sencilla para el paciente, al poder ser administradas mediante inyección.

Infecciones oculares herpéticas

Los virus del herpes que afectan al hombre son: el herpes simple tipo 1 y tipo 2, herpes zoster, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr. La mayoría de las infecciones por virus del herpes son debidas a una reactivación del virus que ha permanecido latente desde la infección primaria. Estas infecciones son comunes y con frecuencia graves en pacientes inmunodeprimidos, y en función de la inmunodepresión la severidad de las manifestaciones clínicas aumentan como consecuencia de la reactivación del virus⁸⁹. Dentro de las afecciones oculares generadas por los herpes virus se incluyen las uveítis herpéticas, el herpes zoster oftálmico, la queratitis, la retinitis por citomegalovirus y la necrosis retiniana aguda.

Las uveítis herpéticas (inflamación del tracto uveal debida al virus herpes simple o zoster) suelen acompañarse de una elevación importante de la presión intraocular y la aparición tardía de una atrofia sectorial del iris. Las uveítis por herpes también pueden afectar el segmento posterior en forma de vasculitis

⁸⁵ Menei, P., Venier, M.C., Gamelin, E., Saint-André, J.P., Hayek, G., Fournier, D., Mercier, P., Guy, G. y Benoit, J.P. Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma. *Cancer*, 86: 325-330 (1999).

⁸⁶ Peyman, G.A. Clearance of microsphere-entrapped 5-fluorouracil and cytosine arabinoside from the vitreous of primates. *Int. Ophthalmol.*, 16: 109-113 (1992).

⁸⁷ Moritera, T., Ogura, Y., Honda, Y. y Wada, R. Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1785-1790 (1991).

⁸⁸ Khoobehi, B., Stradtman, M.O., Peyman, G.A. y Aly, O.M. Clearance of sodium fluorescein incorporated into microspheres from the vitreous after intravitreal injection. *Ophthalmic. Surg.*, 22: 175-180 (1991).

⁸⁹ Meyers, J.D. Treatment of herpesvirus infections in the immunocompromised host. *Scan. J. Infect. Dis.*, 47 (suppl.): 128-136 (1985).

retinianas oclusivas, provocando opacidad y exacerbación vítrea, y a menudo la desinserción posterior del vítreo.

El herpes zoster oftálmico es una infección de la primera división del nervio trigémino, causada por el virus varicela zoster. La incidencia aumenta con la edad, el grado de inmunodepresión del paciente y enfermedades tales como leucemias y linfomas. Esta enfermedad cursa con inflamación de la córnea, conjuntiva, esclera e iris. La conjuntivitis y episcleritis tienden a aparecer pronto, mientras que la queratitis e iritis aparecen a las 2 ó 3 semanas después del brote. Se ha demostrado que la efectividad del aciclovir por vía tópica es superior a la de los esteroides por la misma vía en el tratamiento de la queratouveitis inducida por herpes zoster, en términos no sólo de la duración del tratamiento sino también en la reactivación o recurrencias de la enfermedad⁹⁰.

La queratitis por herpes simple es la principal causa de ceguera en Estados Unidos, y está producida predominantemente por el virus del herpes simple tipo 1. La vía de infección del herpes ocular se atribuye probablemente a una enfermedad herpética orofacial primaria, con diseminación del virus al ojo por los dedos⁹¹. La queratoconjuntivitis herpética se debe diagnosticar diferenciándola del herpes zoster, infecciones por clamidias y otros tipos de queratoconjuntivitis. El herpes del ojo provoca erosión recurrente dolorosa, que a veces cuando no se trata puede conducir a una queratitis más profunda del estroma y posteriormente ceguera. El tratamiento que hasta el momento ha demostrado ser más efectivo es la administración de aciclovir⁹².

⁹⁰ McGill, J. Herpes zoster ocular infection. *Scan. J. Infect. Dis.*, 47 (suppl.): 85-88 (1985).

⁹¹ Hwang, Y.S. y Spruance, S.L. The epidemiology of uncommon herpes simplex virus type 1 infections. *Herpes*, 6: 16-19 (1999).

⁹² Koliopoulos, J. Acyclovir – a promising antiviral agent: a review of the preclinical and clinical data in ocular herpes simplex management. *Ann. Ophthalmol.*, 16: 19-24 (1984).

La retinitis por citomegalovirus es la infección oportunista más frecuente en pacientes con SIDA, enfermos inmunodeprimidos (con leucemias o linfomas) o que siguen tratamiento con inmunosupresores. Aunque la mayoría de los pacientes responden al tratamiento sistémico, éste no está exento de inconvenientes tales como: altos índices de reactivación, toxicidad, sepsis, costes elevados y deterioro de la calidad de vida. En aquellos pacientes en los que ha fallado o no se puede instaurar una terapia sistémica, se puede recurrir a la administración intravítrea, en la que el tratamiento con ganciclovir y foscarnet se ha mostrado altamente efectivo⁹³, aunque se han descrito reacciones adversas derivadas de las inyecciones repetidas.

La necrosis retiniana aguda es una retinitis necrosante extremadamente rara, pero con efectos devastadores. Fue descrita por primera vez por Urayama *et al*⁹⁴. Este síndrome se ha asociado con una infección causada por el virus del herpes zoster, el virus del herpes simple tipos 1 y 2, y más recientemente se ha encontrado que también puede ser ocasionada por virus del herpes tipo 6, citomegalovirus y virus Epstein-Barr^{95,96,97,98}. Afecta a individuos sanos de cualquier edad, con predominio en adultos y sexo masculino. También se han descrito casos en pacientes inmunodeprimidos, especialmente enfermos con SIDA. La enfermedad cursa con una pérdida rápida de visión. Se trata de un síndrome que se manifiesta al comienzo con una uveítis anterior leve, seguida de vitritis y

⁹³ Negro, S. y Fernández-Carballido, A.M. Intravitreal administration of antiviral agents: repeated injections or implants?. *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.*, 78: 647-648 (2003).

⁹⁴ Urayama, A., Yamada, N., Sasaki, T., Mishiyama, Y., Watanabe, H. y Wakusawa, S. Unilateral acute anterior uveitis with periarteritis and detachment. *Jpn. J. Clin. Ophthalmol.*, 25: 607-619 (1971).

⁹⁵ Reux, I., Fillet, A.M., Agut, H., Katlama, C., Hauw, J.J. y LeHoang, P. In situ detection of human herpes virus 6 in retinitis associated with AIDS. *Am. J. Ophthalmol.*, 114: 375-376 (1992).

⁹⁶ Kuppermann, B.D., Quiceno, J.I., Wiley, C., Hesselink, J., Hamilton, R., Keefe, K., García, R. y Freeman, W.R. Clinical and histopathologic study of varicella zoster virus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol.*, 118: 589-600 (1994).

⁹⁷ Sado, K., Kimura, T., Hotta, Y., Sakuma, H., Hayakawa, M.K.K. y Kanai, A. Acute retinal necrosis syndrome associated with herpes simplex keratitis. *Retina*, 14: 260-263 (1994).

⁹⁸ Culbertson, W.W., Blumenkranz, M.S., Haines, H., Pepose, J.S., Stewart, J.A., y Curtin, V.T. The acute retinal necrosis syndrome. Histopathology and etiology. *Ophthalmology*, 89: 1317-1324 (1982).

arteritis oclusiva del nervio óptico y la retina. Esta última desencadena una necrosis retiniana masiva, de predominio periférico, que suele acompañarse de agujeros retinianos grandes y desprendimiento de retina de mal pronóstico⁹⁹. Además, el segundo ojo se afecta en un plazo de varios días o semanas. En el tratamiento de dicha patología se han utilizado antibióticos, corticoides y agentes citotóxicos, pero los resultados no han sido satisfactorios. El tratamiento más eficaz se ha conseguido con antivirales como el aciclovir por vía sistémica, aunque en aquellos pacientes que no responden y para controlar la rápida destrucción retiniana resulta de gran utilidad la administración de inyecciones intravítreas.

Tratamiento de infecciones herpéticas oculares con agentes antivirales

Como ha quedado reflejado en los apartados anteriores, el tratamiento de las enfermedades por el virus del herpes se lleva a cabo mediante la administración de fármacos antivirales. En la actualidad, la clasificación de los mismos es relativamente sencilla porque hay muy pocos virus susceptibles de quimioterapia eficaz. Con cierta frecuencia aparece en la literatura la división de estos fármacos en nucleósidos y no nucleósidos, siendo los primeros análogos de bases púricas o pirimidínicas capaces de sustituir a las naturales e interferir en el proceso de replicación del ADN viral. Puesto que el proceso de replicación es muy parecido al de la célula huésped, estos fármacos son, por lo general, demasiado tóxicos para uso sistémico y se emplean sólo en aplicación tópica. Una excepción a esta regla son los agentes que son capaces de distinguir, por cualquier mecanismo, entre célula normal e infectada. Ejemplos son el aciclovir^{100,101} o la ribavirina, que pasan a la forma activa por la acción de un enzima que sólo se encuentra en las células infectadas. En este grupo se engloban la mayor parte de los fármacos antivirales

⁹⁹ **Atherton, S.S.** Acute retinal necrosis: insights into pathogenesis from the mouse model. *Herpes*, 8: 69-73 (2001).

¹⁰⁰ **Elion, G.B.** Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.*, 73: 7-13 (1982).

¹⁰¹ **Keeney, R.E., Kirk, L.E. y Brigden, D.** Acyclovir tolerance in humans. *Am. J. Med.*, 73: 176-181 (1982).

como el valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir, brivudina, sorivudina y A-5021. Entre ellos, los más utilizados en oftalmología son el aciclovir, vidarabina, ganciclovir y foscarnet¹⁰². A su vez, los antivirales no nucleósidos agrupan a aquellos que actúan por mecanismos distintos de la interferencia con la ADN polimerasa viral, y por tanto, es un grupo heterogéneo. Entre estos se encuentra el formivirsen, y otros compuestos que se hallan en las primeras fases de desarrollo clínico o preclínico como el benzimidavir, BAY 38-4766 y BILD 1633 SER¹⁰³.

Aciclovir

El nombre químico del aciclovir es 9-[(2-hidroxietoxi)metil]guanina, 2-amino-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-1,9-dihidro-6*H*-purin-6-ona, acicloguanosina¹⁰⁴. Es un polvo cristalino blanco o casi blanco, ligeramente soluble en agua, con una solubilidad de 1,3 mg/ml a 25°C.

El potencial clínico del aciclovir se encuentra ampliamente confirmado. Descubierta por G. Elion, fue el primer inhibidor selectivo utilizado frente al virus del herpes simple¹⁰⁵. El aciclovir es activo *in vitro* frente a los virus del herpes simple tipos 1 y 2, herpes zoster, Epstein-Barr y, en menor grado, citomegalovirus. A pesar de que los resultados cuantitativos pueden variar considerablemente dependiendo de la cadena viral y de los aspectos metodológicos del sistema de ensayo empleados, en general el virus del herpes simple tipo 1 es el más susceptible, seguido en orden descendente de susceptibilidad por los virus herpes

¹⁰² Teich, S.A., Cheung, T.W. y Friedman, A.H. Systemic antiviral drugs used in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*, 37: 19-53 (1992).

¹⁰³ Naesens, L. y De Clercq, E. Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes*, 8: 12-16 (2001).

¹⁰⁴ O'Neil, M.J., Smith, A. y Heckelman, P.E. The Merck Index, 13ª edición. Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, 28 (2001).

¹⁰⁵ Roizman, B. y Whitley, R.J. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes*, 8: 23-27 (2001).

simple tipo 2, herpes zoster, Epstein-Barr y citomegalovirus¹⁰⁶. Frente al virus del herpes simple tipos 1 y 2, el aciclovir es más potente *in vitro* que los análogos nucleósidos de idoxuridina, trifluridina o vidarabina, presenta una potencia similar a la 2'-fluoro-5-yodoarabinosilcitosina y a la del ganciclovir, y resulta más potente que la bromovinildeoxiuridina frente al virus herpes simple tipo 2 pero es menos potente frente al virus del herpes simple tipo 1¹⁰⁷. A su vez, el aciclovir es menos activo frente a citomegalovirus que idoxuridina, trifluridina, vidarabina y ganciclovir. En modelos animales, al evaluar la latencia *in vitro* se ha comprobado que interrumpe la infección productiva de herpes simple, pero no es capaz de erradicar el foco viral latente. Una explicación para este hecho es que la reactivación de todos los virus latentes no se produce de manera simultánea, siendo difícil alcanzar la adecuación óptima entre la exposición al fármaco requerida para una interacción adecuada entre el agente antiviral y las enzimas inducidas por el virus, quedando siempre parte del reservorio viral como fuente de futuras infecciones tras la retirada del fármaco del medio¹⁰⁸. La incidencia de recurrencias se puede reducir mediante tratamientos prolongados, lo que es importante en pacientes inmunodeprimidos.

El mecanismo de acción del aciclovir implica una inhibición altamente selectiva de la replicación del ADN, con una toxicidad extremadamente baja para las células huésped no infectadas. Esta selectividad se debe a una fosforilación secuencial y específica del fármaco por la timidinkinasa codificada por el virus del herpes.

¹⁰⁶ O'Brien, J.J. y Campoli-Richards, D.M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 37: 233-309 (1989).

¹⁰⁷ Collins, P. The spectrum of antiviral activities of acyclovir *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 12 (suppl. B): 19-27 (1983).

¹⁰⁸ Klein, R.J., Friedman-Kien, A.E. y DeStefano, E. Effect of discontinuous acyclovir treatment on the *in vitro* reactivation of herpes simplex virus from latently infected trigeminal ganglia. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 129-131 (1983).

El beneficio clínico de la administración de aciclovir por vía tópica ocular en infecciones oculares por el virus del herpes simple fue demostrado por primera vez por Jones *et al.*¹⁰⁹ mostrando que la pomada oftálmica prevenía completamente las recurrencias tempranas de las lesiones dendríticas comparado con una incidencia de más del 50% en el grupo control placebo. En ensayos comparativos frente a estas infecciones ha demostrado ser más activo que la idoxuridina y vidarabina y ha presentado una actividad semejante a la fluorotimidina^{110,111,112,113}.

Este fármaco pertenece a la clase III de la clasificación biofarmacéutica¹¹⁴. Su biodisponibilidad por vía oral es baja e irregular (15-30%), alcanzando la concentración plasmática máxima al cabo de 1,5 horas. Para mejorar la absorción se han utilizado profármacos¹¹⁵ cuya única ventaja sobre el aciclovir es que permiten reducir el número de dosis diarias a dos o tres al día. Debido a su baja solubilidad en agua y a su escasa penetración corneal también se han utilizado profármacos del tipo ésteres de aminoácidos para administración tópica ocular¹¹⁶. El aciclovir se distribuye ampliamente por los tejidos y fluidos orgánicos. Difunde bien a través de la barrera meníngea (aún en ausencia de inflamación). Se une en un 15% a las proteínas plasmáticas y se elimina mayoritariamente inalterado por

¹⁰⁹ Jones, B.R., Coster, D.J., Fison, P.N., Thompson, G.M., Cobo, L.M. y Falcon, M.G. Efficacy of acycloguanosine (Wellcome 248U) against herpes simplex corneal ulcers. *Lancet*, i: 243-244 (1979).

¹¹⁰ Collum, L.M.T., Benedict-Smith, A. y Hillary, I.B. Randomised double-blind trial of acyclovir and idoxuridine in dendritic corneal ulceration. *Br. J. Ophthalmol.*, 64: 766-769 (1980).

¹¹¹ Colin, J., Tournoux, A., Chastel, C. y Renard, G. Superficial herpes simplex keratitis. Double blind comparative trial of acyclovir and idoxuridine. *Nouv. Presse Med.*, 10: 2969-2975 (1981).

¹¹² Young, B.J., Patterson, A. y Ravenscroft, T. A randomised double-blind clinical trial of acyclovir (Zovirax) and adenine arabinoside in herpes simplex corneal ulceration. *Br. J. Ophthalmol.*, 66: 361-363 (1982).

¹¹³ La Lau, C., Oosterhuis, J., Versteeg, J., Van Rij, G., Renardel de Lavalette, J.G.C., Craandijk, A. y Lamers, W.P.M.A. Acyclovir and trifluoro thymidine in herpetic keratitis: a multicentre trial. *Br. J. Ophthalmol.*, 89: 1195-1200 (1982).

¹¹⁴ Dressman, J.B. y Lennernäs, H. Oral drug absorption. Prediction and assessment. Marcel Dekker, Inc. New York, 173 (2000).

¹¹⁵ Parfitt, K., Sweetman, S.C., Blake, P.S. y Parsons, A.V. Martindale, 32ª edición. The Royal Pharmaceutical Press, London, 602-606 (1999).

¹¹⁶ Lee, V.H. y Bundgaard, H. Improved ocular drug delivery with prodrugs. *Prodrugs. Topical and ocular drug delivery*. Sloan, K.B. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 238- 262 (1992).

vía renal. Su semivida de eliminación es de 3 horas¹¹⁷, siendo necesario administrar 5 dosis al día si se quieren mantener concentraciones terapéuticas.

Cuando se administra por vía intravítrea en modelos animales (conejo albino), su velocidad de eliminación es muy rápida, con una semivida de 2,98 horas¹¹⁸.

Mientras que la administración de aciclovir por vía oral prácticamente no se asocia a efectos adversos severos, la administración tópica oftálmica puede producir efectos secundarios tales como queratopatía *punctata* superficial, quemaduras y escozor local. Por vía parenteral se han descrito tromboflebitis, inflamación y edema local. El mayor problema que plantea la utilización intravenosa de aciclovir es su repercusión sobre la función renal, observándose un incremento de la creatinina sérica e insuficiencia renal reversible por precipitación tubular. Las alteraciones neurológicas son poco frecuentes si bien su incidencia aumenta en los enfermos inmunodeprimidos.

Polímeros empleados en la elaboración de microesferas

Uno de los criterios fundamentales en la elección del material polimérico utilizado en la preparación de las microesferas es su biocompatibilidad¹¹⁹. Entre los polímeros más empleados para uso oftálmico se encuentran los siguientes¹²⁰:

¹¹⁷ **Physicians' Desk Reference.** 55ª edición. Medical Economics Company Inc., Montvale, 1510-1515 (2001).

¹¹⁸ **Hughes, P.M., Krishnamoorthy, R. y Mitra A.K.** Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdialysis technique. *J. Ocul. Pharm. Ther.*, 12: 209-224 (1996).

¹¹⁹ **Finch, C.A.** Polymers for microcapsule wall. *Chem. Ind.*, 22: 752-756 (1985).

¹²⁰ **Sintzel, M., Bernatchez, S., Tabatabay, C. y Gurny, R.** Biomaterials in ophthalmic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42: 358-374 (1996).

1. Naturales y semisintéticos:

- Polisacáridos: Derivados de la celulosa (éteres y ésteres de celulosa¹²¹), ácido hialurónico, condroitin sulfato, quitosano^{122,123}, dextrano, xantano, goma gelan, ácido algínico, carragenatos, goma arábica, tragacanto y agar-agar.
- Polipéptidos: Gelatina¹²⁴, albúmina^{125,126,127} y colágeno¹²⁸.

2. Polímeros sintéticos:

- Polímeros sintéticos biodegradables: ácido láctico¹²⁹, ácido glicólico y

¹²¹ Chan, L.W., Heng, P.W. y Wan, L. S.C. Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification. *J. Microencapsul.*, 14: 545-555 (1997).

¹²² Ohya, Y., Takey, T., Kobayashi, H. y Ouchi, T. Release behaviour of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition. *J. Microencapsul.*, 10: 1-9 (1993).

¹²³ Chithambara-Thano, B., Sunny, M.C. y Jayakrishnan, A. Cross-linked chitosan microspheres: Preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44: 283-286 (1992).

¹²⁴ Hashida, M., Takahashi, Y., Muranishi, S. y Sezaki, H. An application of water in oil and gelatin microsphere-in-oil emulsion to specific delivery of anticancer agents in stomach lymphatics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 5: 241-255 (1977).

¹²⁵ Chen, G.Q., Lin, W., Coombes, G.A., Davis, S.S. y Illum, L. Preparation of human serum albumin microspheres by a novel acetone-heat denaturation method. *J. Microencapsul.*, 11: 395-407 (1994).

¹²⁶ Leucuta, S.E. The kinetics of in vitro release and the pharmacokinetics of miotic response in rabbits of gelatin and albumin microspheres with pilocarpine. *Int. J. Pharm.*, 54: 71-78 (1989).

¹²⁷ Dilova, V. y Shishova, V. Albumin microspheres as a drug delivery system for dexamethasone: pharmaceutical and pharmacokinetic aspects. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 987-989 (1993).

¹²⁸ Rubin, A.L., Stenzel, K.H., Miyata, T., White, M.J. y Dunn, M. Collagen as a vehicle for drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.*, 14: 309-312 (1973).

¹²⁹ Moritera, T., Ogura, Y., Yoshimura, N., Honda, Y., Wada, R., Hyon, S.H. y Ikada, Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 1325-1330 (1992).

sus copolímeros^{130,131,132}, poli-ε-caprolactona,, polianhidridos, polialquilcianoacrilatos y poliortoesteres entre otros.

- Polímeros sintéticos no biodegradables: alcohol polivinílico, ácido acrílico, derivados polimetilmetacrilato, hidroxietilmetacrilato, ácido poliacrílico, poliacrilamida, silicona, poliuretano, policarbonato y polisulfona, polímeros del estireno y fluoropolímeros.

En un primer momento se emplearon polímeros naturales biológicos, como son: hemoglobina¹³³, albúmina, seroalbúmina^{134,135}, colágeno y gelatina. Sin embargo, su escasa pureza y el desarrollo de los polímeros biosintéticos como los poliésteres alifáticos, poliaminoácidos¹³⁶ y otros, han restringido su utilización.

¹³⁰ **Moritera, T., Ogura, Y., Honda, Y. y Wada, R.** Microspheres of biodegradable polymers as a drug delivery system in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1785-1790 (1991).

¹³¹ **Khoobehi, B., Stradtman, M.O., Peyman, G.A. y Aly, O.M.** Clearance of fluorescein incorporated into microspheres from the cornea and aqueous humor after subconjunctival injection. *Ophthalmic. Surg.*, 21: 840-844 (1991).

¹³² **Khoobehi, B., Stradtman, M.O., Peyman, G.A. y Aly, O.M.** Clearance of fluorescein incorporated into microspheres from the cornea and aqueous humor after intravitreal injection. *Ophthalmic. Surg.*, 22: 175-180 (1991).

¹³³ **Willmot, N., Cummings, J. y Florence, A.T.** In vitro release of adriamycin from drug loaded albumin and haemoglobin microspheres. *J. Microencapsul.*, 2: 293-304 (1985).

¹³⁴ **Widder, K.J., Flouret, G. y Senyei, A.E.** Magnetic microspheres synthesis of a novel parenteral drug carrier. *J. Pharm. Sci.*, 68: 79-82 (1979).

¹³⁵ **Morimoto, Y., Sugibayashi, K. y Kato, Y.** Drug carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. V: antitumor effect of microspheres entrapped adriamycin on liver metastasis of AH 7974 cells in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, 29: 1433-1438 (1981).

¹³⁶ **Urry, D.W.** Bioelastic materials as chemomechanically transducing ("smart") matrices for drug delivery. *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers*. Cheng, T., Gelebein, C.G. y Yang, V.C. (ed.), Kluwer academic/Plenum Press, Ann Arbor, 181-192 (1992).

Entre los poliésteres alifáticos se encuentran el ácido poliláctico (PLA)^{137,138,139}, el ácido poliglicólico (PGA) y el copolímero láctico-glicólico (PLAGA) que han suscitado en los últimos años la mayor atención, por tratarse de polímeros biodegradables y biocompatibles¹⁴⁰.

En la preparación de microesferas destinadas a la administración por vía intraocular se deben utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles. La ventaja de estos polímeros es que, una vez administrada la formulación en el lugar de acción, el fármaco es liberado de forma controlada y el polímero se degrada paulatinamente en productos biológicos de fácil eliminación. A tal efecto, resulta particularmente interesante la utilización de copolímeros derivados de los ácidos láctico y glicólico (PLAGA)¹⁴¹.

El copolímero láctico-glicólico se hidroliza en ácidos láctico y glicólico, metabolitos biocompatibles y carentes de toxicidad^{142,143}. El ácido láctico es un producto metabólico de algunos aminoácidos. El ácido poliglicólico es cristalino, quebradizo y con un proceso de degradación muy rápido, mientras que el ácido poliláctico es resistente y poco elástico, con un bajo grado de permeabilidad, lo que prolonga su hidrólisis durante meses.

¹³⁷ Benita, S., Benoit, J.P., Puisieux, F. y Thies, C. Characterization of drug loaded poly(*d,l*-lactide) microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 73: 1721-1724 (1984).

¹³⁸ Bodmeier, R. y Chen, H. Preparation of biodegradable poly(±)lactide microparticles using a spray-drying technique. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 754-757 (1988).

¹³⁹ Cavalier, M., Benoit, P. y Thies, C. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly(±)lactide microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38: 249-253 (1986).

¹⁴⁰ Chu, C.C. Degradation phenomena of two linear aliphatic polyester fibres used in medicine and surgery. *Polymerization*, 26: 591-594 (1985).

¹⁴¹ Shah, S.S., Cha, Y. y Pitt, C.G. Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?. *J. Control. Release*, 18: 261-270 (1992).

¹⁴² Sansdrap, P. y Möes, A.J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, 43: 47-58 (1997).

¹⁴³ Menei, P., Daniel, V., Montero-Menei, C., Brouillard, M., Pouplard-Barthelaix, A. y Benoit, J.P. Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials*, 14: 470-478 (1993).

El grado de cristalinidad del polímero depende de la proporción de los dos monómeros que lo componen. Así, a medida que aumenta el porcentaje de ácido glicólico, el polímero es más amorfo, con un límite del 70%¹⁴⁴. A partir de este punto el proceso es inverso, ya que la cristalinidad del copolímero aumenta. La duración del proceso de degradación del polímero es variable, viéndose modificado en función de su composición¹⁴⁵ así, la velocidad de degradación del polímero se ve incrementada en el siguiente orden: L-PLA < DL-PLAGA 75:50 < DL-PLAGA 50:50¹⁴⁶. También el peso molecular final del copolímero es fundamental¹⁴⁷ de manera que dentro de un mismo grupo, aquellos de menor peso molecular presentan una semivida más corta que los de mayor peso molecular, lo que condiciona la velocidad de cesión del fármaco incorporado en las microesferas^{148,149}.

Técnicas de microencapsulación

El número de técnicas de microencapsulación ha experimentado un crecimiento continuo en los últimos tiempos. La elección de una de ellas depende de la naturaleza tanto del polímero como de la sustancia activa a encapsular. Las técnicas de microencapsulación más empleadas, agrupadas en función del método de formación de las micropartículas, se citan a continuación:

¹⁴⁴ **Gilding, D.K. y Reed, A.M.** Biodegradable polymers for use in surgery - poly (glycolic)/poly (lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymer*, 20: 1459-1464 (1979).

¹⁴⁵ **Cutright, D.E., Pérez, B., Beasley, J.D., Larson, W.J. y Posey, W.R.** Degradation of poly (lactic acid) polymer and co-polymers of poly (glycolic acid). *Oral Surg.*, 37: 142-152 (1974).

¹⁴⁶ **Witschi, C. y Doelker, E.** Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly (lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Control. Release*, 51: 327-341 (1998).

¹⁴⁷ **Spenlehauer, G., Vert, M.M., Benoit, J.P., Chabot, F. y Veillard, M.** Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics. *J. Control. Release*, 7: 217-229 (1988).

¹⁴⁸ **Jalil, R. y Nixon, J.R.** Microencapsulation using poly (DL lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *J. Microencapsul.*, 7: 357-374 (1990a).

¹⁴⁹ **Park, T.G.** Degradation of poly (DL-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Control. Release*, 30: 161-173 (1994).

Métodos químicos

- Técnica de policondensación interfacial¹⁵⁰.

Métodos mecánicos

- Técnica de atomización¹⁵¹.
- Técnica de atomización-congelación.
- Técnica de suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluido.

Métodos físicos

- Técnica de coacervación o separación de fases:
 - En medio acuoso:
 - Coacervación simple.
 - Coacervación compleja¹⁵².
 - En medio no acuoso¹⁵³.
- Técnica de evaporación del disolvente

El último grupo de métodos de microencapsulación incluyen aquellos en los que el factor desencadenante de la formación de las micropartículas es la

¹⁵⁰ **Makino, K., Arakawa, M. y Kondo, T.** Preparation and in vitro degradation properties of poly (lactide) microspheres. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 1195-1201 (1985).

¹⁵¹ **Bodmeier, R. y Chen, H.** Preparation of biodegradable poly(±)-lactide microparticles using a spray-drying technique. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 754-757 (1988).

¹⁵² **Nixon, J.R. y Walker, S.E.** The in vitro evaluation of gelatin coacervate microcapsules. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23 (suppl.): 147 (1971).

¹⁵³ **Nack, H.** Microencapsulation techniques. Application and problems. *J. Soc. Cosmetic Chemists*, 21: 85-98 (1970).

eliminación del disolvente volátil, en el que previamente se ha solubilizado el polímero.

Básicamente, el protocolo general del proceso es el siguiente:

1. Disolución o dispersión del principio activo en una solución del polímero formador de la cubierta.
2. Emulsificación de la mezcla en una fase inmiscible que constituirá, a su vez, la fase continua de la emulsión.
3. Formación de las micropartículas sólidas, tras la evaporación del disolvente volátil del polímero, proceso que puede realizarse a temperatura ambiente o con aplicación de calor, a presión atmosférica o en condiciones de vacío, así como con distintos tipos e intensidades de agitación.

La técnica convencional de evaporación del disolvente se refiere a una emulsión O/A, si bien otras variantes aluden a emulsiones A/O, O/O y A/O/A^{154,155}.

- Emulsión O/A: Esta técnica se empezó a utilizar a finales de los años 70 para la encapsulación de hormonas^{156,157}. Es la más sencilla y ofrece buenos resultados, aunque está restringida a principios activos insolubles o casi insolubles en agua no susceptibles de ser degradados por el disolvente orgánico empleado. Generalmente, se recurre al diclorometano como disolvente del polímero debido a su bajo punto de ebullición a presión atmosférica (38,5°C) y

¹⁵⁴ **Tice, T.R. y Gilley, R.M.** Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. *J. Control. Release*, 2: 343-352 (1985).

¹⁵⁵ **Bodmeier, R. y McGinity, J.W.** Poly (lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. I. Methods and morphology. *J. Microencapsul.*, 4: 279-288 (1987a).

¹⁵⁶ **Beck, L., Cowsar, D., Lewis, D. y Cosgrove, R.** A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.*, 31: 545-551 (1979).

¹⁵⁷ **Sanders, L.M., Kent, J.S., McRae, G.I., Wickery, B.H., Tice, T.R. y Lewis, D.H.** Controlled release of leutinizing hormone-releasing hormone analogue from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 73: 1294-1297 (1984).

a su limitada solubilidad en agua (2%), aunque a veces se prefiere el uso de cloroformo por sus características como disolvente de compuestos poliméricos¹⁵⁸.

- Emulsión A/O: Se utiliza fundamentalmente para la encapsulación de productos muy solubles en agua, viéndose favorecida la afinidad de éstos por la fase interna acuosa.
- Emulsión O/O: Esta técnica se emplea fundamentalmente para compuestos muy solubles en agua, que además deben tener cierta afinidad por el agente constituyente de la fase interna de la emulsión, pero evitando cualquier tipo de afinidad por el aceite que constituye la fase externa. Los disolventes más usados son acetona y acetonitrilo. Este procedimiento se ha utilizado para la encapsulación de 5-fluorouracilo y ganciclovir, para administración intravítrea^{159,160,161}.
- Emulsión A/O/A: Es una técnica válida únicamente para compuestos muy solubles en agua y de gran tamaño. Se forma una doble emulsión, en primer lugar se obtiene una emulsión A/O, donde la sustancia activa queda incluida en la fase interna. A continuación, esta emulsión se incorpora formando parte de

¹⁵⁸ **Jalil, R. y Nixon, J.R.** Biodegradable poly(lactic acid) and poly (lactic-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. *J. Microencapsul.*, 7: 297-327 (1990c).

¹⁵⁹ **Moritera, T., Ogura, Y., Honda, Y. y Wada, R.** Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1785-1790 (1991).

¹⁶⁰ **Refojo, M.F. y Herrero-Vanrell, R.** Sustained delivery of ganciclovir from biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres. *ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale Florida*, 2743 (1996).

¹⁶¹ **Herrero-Vanrell, R., Barcia, E., Negro, S. y Refojo, M.F.** Development of ganciclovir microspheres from poly(D,L-lactic-co-glycolide) acid for the treatment of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 8: 237-240 (1998).

la fase interna de otra, de fase externa acuosa^{162,163,164}.

Factores que influyen en las características de las microesferas

Entre los factores que pueden modificar las características de las microesferas obtenidas por la técnica de evaporación del solvente se encuentran: la velocidad de evaporación del solvente orgánico^{165,166}, la concentración de polímero¹⁶⁷, la velocidad de agitación¹⁶⁸, la concentración de agente emulsificante¹⁶⁹ y la cantidad de sustancia activa.

De forma particular, la velocidad de cesión de la molécula activa, a partir de las micropartículas preparadas con PLAGA, aumenta al disminuir el peso molecular del polímero, debido a que la temperatura a la cual se produce la transición vítrea decrece a medida que lo hace el peso molecular, potenciándose de esta forma la erosión de la cubierta y la formación de poros. Desde el punto de vista tecnológico, en las mismas condiciones de trabajo, los copolímeros de menor

¹⁶² Ogawa, Y., Okada, H., Heya, T. y Skimamoto, T. Controlled release of LHRH agonist, leuprolide acetate from microspheres: serum drug level profiles and pharmacological effects in animals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41: 439-444 (1989).

¹⁶³ Uchida, T., Yoshida, K. y Goto, S. Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing water-soluble dyes using a novel w/o/w emulsion solvent evaporation method. *J. Microencapsul.*, 13: 219-228 (1996).

¹⁶⁴ Jeffery, H., Davis, S.S. y O'Hagan, D.T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. *Pharm. Res.*, 10: 362-368 (1993).

¹⁶⁵ Izumikawa, S., Yoshiok, S., Aso, Y. y Takeda, Y. Preparation of poly (L-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *J. Control. Release*, 15: 133-140 (1991).

¹⁶⁶ Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (DL lactic acid) I: Effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J. Microencapsul.*, 7: 255-259 (1990d).

¹⁶⁷ Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (L lactic acid) II: Effect of preparative variables affecting microcapsule properties. *J. Microencapsul.*, 7: 25-39 (1990e).

¹⁶⁸ Sansdrap, P. y Möes, A.J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.*, 98: 157-164 (1993).

¹⁶⁹ Sjostrom, B., Bergenstahl, B. y Kronberg, B. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in-water emulsions. II: Influence of the emulsifier, the solvent and the drug substance. *J. Pharm. Sci.*, 82: 584-589 (1993).

peso molecular conducen a microesferas más pequeñas, obteniéndose además un menor rendimiento del proceso. Sin embargo, la morfología de las microesferas, su encapsulación y su densidad no se ven afectadas por el peso molecular del polímero¹⁷⁰.

La velocidad de cesión del fármaco a partir de las microesferas también se puede modificar mediante el empleo de agentes moduladores que se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Agentes moduladores durante el proceso de microencapsulación: agentes plastificantes¹⁷¹, agentes formadores de canales^{172,173,174,175,176}, agentes impermeabilizantes¹⁷⁷, agentes reticulantes¹⁷⁸, así como la utilización de

¹⁷⁰ **Jalil, R. y Nixon, J.R.** Microencapsulation using poly (DL lactic acid) II: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J. Microencapsul.*, 7: 260-269 (1990b).

¹⁷¹ **García-Encina, G., Seijo, B., Vila-Jato, J.L. y Torres, D.** Microcápsulas en tecnología farmacéutica. *Ind. Farm.*, Mayo-Junio: 33-42 (1993).

¹⁷² **Péan, J.M., Boury, F., Venier-Julienne, M.C., Menei, P., Proust, J.E. y Benoit, J.P.** Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?. *Pharm. Res.*, 16: 1294-1299 (1999).

¹⁷³ **Samuelov, Y., Donbrow, M. y Friedman, M.** Sustained-release of drugs from ethylcellulose poly ethylene glycol films and kinetics of drugs release. *J. Pharm. Sci.*, 68: 325-329 (1979).

¹⁷⁴ **Donbrow, M. y Friedman, M.** Enhancement of permeability of ethylcellulose films for drug penetration. *J. Pharm. Pharmacol.*, 27: 633-646 (1975).

¹⁷⁵ **Pongpaibul, Y., Maruyame, K. y Iwatsuru, M.** Formation and in vitro evaluation of theophylline-loaded poly (methyl methacrylate) microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 530-533 (1988).

¹⁷⁶ **Leelarasamee N., Howard, S.A., Malanga, C., Luzzi, L., Hogan, F., Kandzari, S. y Ma, K.** Kinetics of drug release from polylactic acid hydrocortisone microcapsules. *J. Microencapsul.*, 3: 171-179 (1986).

¹⁷⁷ **Motycka, M. y Nairn, J.C.** Preparation and evaluation of microencapsulated ion-exchange resin beads. *J. Pharm. Sci.*, 68: 211-215 (1979).

¹⁷⁸ **Egbaria, K. y Friedman, M.** Release profiles of metronidazole and l-phenylalanine from individual albumin microspheres. *J. Control. Release*, 14: 215-220 (1990).

determinadas sustancias adicionadas al medio de cesión^{179,180,181,182}.

El estudio de microesferas para la administración intraocular de fármacos ha constituido una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio en los últimos años. En este sentido, los trabajos de investigación realizados hasta el momento han permitido el desarrollo y optimización de estos sistemas microparticulares¹⁸³.

Herrero-Vanrell y col.¹⁸⁴ elaboraron microesferas de PLAGA y ganciclovir con el objetivo de obtener una formulación esterilizada de microesferas PLAGA para la liberación controlada intraocular de ganciclovir. Los resultados mostraron que la dispersión del fármaco en FSiO aumentaba la eficiencia de encapsulación, con valores de hasta un 95% en microesferas de 300-500 µm. Estas microesferas cedieron ganciclovir hasta el día 21 de forma constante, pero luego la velocidad disminuyó desde el día 25 hasta el día 42 (final del ensayo de cesión). No se observaron diferencias significativas en el perfil de cesión después de la esterilización.

¹⁷⁹ **Yang, J. y Cleland, J.L.** Factors affecting the *in vitro* release of recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ) from PLGA microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 86: 908-914 (1997).

¹⁸⁰ **Cha, Y. y Pitt, C.G.** A one-week subdermal delivery system for methadone based on biodegradable microcapsules. *J. Control. Release*, 7: 69-78 (1988).

¹⁸¹ **Makino, K., Arakawa, M. y Kondo, T.** Preparation and *in vitro* degradation properties of poly (lactide) microcapsules. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 1195-1201 (1985).

¹⁸² **Leelarasamee, N. y Ma, K.** Effect of surface active agents on drug release from polylactic acid hydrocortisone microcapsules. *J. Microencapsul.*, 5: 37-46 (1988).

¹⁸³ **Ramirez, L., Pastoriza, P. y Herrero-Vanrell, R.** Biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing tetracaine hydrochloride. *In vitro* release profile. *J. Microencapsul.*, 16: 105-115 (1999).

¹⁸⁴ **Herrero-Vanrell, R., Ramirez, L., Fernández-Carballido, A. y Refojo M.F.** Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, *in vitro* release profiles, and sterilization process. *Pharm. Res.*, 17: 1323-1328 (2000).

Igualmente se obtuvieron resultados interesantes con microesferas de PLAGA para la administración de dexametasona¹⁸⁵. Estos estudios demostraron que la microencapsulación de dexametasona, basada en la técnica de evaporación del solvente daba lugar a rendimientos superiores de encapsulación que los obtenidos con el fosfato de dexametasona, obteniendo eficacias medias de incorporación del fármaco superiores al 66%. También, se puso de manifiesto que un aumento en la cantidad de dexametasona se traducía en un incremento tanto de la dosis como en la cesión inicial del fármaco. La adición de dextrosa generó un aumento de la cantidad cedida de dexametasona, a pH 7,4, durante sólo los dos primeros días del ensayo de cesión, lo que no aportó una ventaja significativa.

Teniendo presente estos estudios y los buenos resultados obtenidos con estas micropartículas, uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido el de desarrollar una formulación para la administración intraocular de un fármaco ampliamente utilizado en infecciones herpéticas como es el aciclovir incluyendo la evaluación de su comportamiento *in vitro*. Asimismo, se ha evaluado la posible modificación de este comportamiento al esterilizar el sistema obtenido.

¹⁸⁵ Álvarez, C., Herrero-Vanrell, R., Negro, S., Molina, I.T., Hernández, M.T., Pastoriza, P. y Barcia, E. Dexametasone microspheres for intravitreal administration. *3rd Spanish Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery*, 83 (1998).

ANTECEDENTES

- La retinitis por herpes simple y la necrosis retiniana aguda son infecciones víricas comunes y con frecuencia graves en pacientes inmunodeprimidos. En función del grado de inmunodepresión las manifestaciones clínicas son más o menos severas, debido a la reactivación del virus¹⁸⁹.
- El aciclovir es un fármaco con actividad antiviral conocida frente a los virus del herpes simple, herpes zoster y Epstein-Barr. Su mecanismo de acción hace que su toxicidad sea baja para las células huésped¹⁹⁰. Constituye el fármaco de elección en el tratamiento de patologías tales como la retinitis por herpes simple y la necrosis retiniana aguda, siendo las vías de administración preferentes la vía intravenosa y la oral¹⁹¹. En aquellos pacientes que no responden a una terapia sistémica, la administración de aciclovir por vía intravítrea, en dosis múltiples, resulta muy interesante, aunque no está exenta de efectos adversos tales como: endoftalmitis, cataratas, atrofia óptica, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina. La utilización de sustancias activas incorporadas en sistemas de liberación controlada permiten reducir los efectos secundarios asociados a la administración de dosis múltiples por vía intravítrea y aumentan el intervalo entre dosis¹⁹², hecho que resulta de interés cuando se trata de fármacos con semivida corta como el aciclovir.

¹⁸⁹ **Meyers, J.D.** Treatment of herpesvirus infections in the immunocompromised host. *Scan. J. Infect. Dis.*, 47 (suppl.): 128-136 (1985).

¹⁹⁰ **O'Brien, J.J. y Campoli-Richards, D.M.** Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 37: 233-309 (1989).

¹⁹¹ **Alexander, L.D.** Diseases of the retina. *Clinical Ocular Pharmacology*, 3ª edición. Barlett, J.D. y Jaanus, S.D. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 809-839 (1995).

¹⁹² **Peyman, G.A. y Schulman, A.** Intravitreal drug therapy. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 33: 392-404 (1989).

- Las micropartículas presentan un notable interés como vehículos transportadores de fármacos destinados a la administración intraocular¹⁹³ al conseguir la liberación del fármaco de forma controlada. Si la estructura de las partículas formadas es matricial, la velocidad de liberación del fármaco incluido en la matriz polimérica depende de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, las características del polímero, la estructura interna del sistema elaborado y de su tamaño¹⁹⁴. También se ha comprobado que la incorporación de determinados aditivos puede modificar la velocidad de liberación de la molécula activa incorporada en las mismas¹⁹⁵.
- El PLAGA es un copolímero biodegradable con un potencial interesante en oftalmología para la preparación de sistemas de liberación controlada como las microesferas¹⁹⁶. Cuando dichos sistemas son preparados con polímeros biodegradables y biocompatibles, se pueden administrar por vía intraocular con efectos adversos mínimos sobre los tejidos oculares. Además, estos polímeros aportan la ventaja de desaparecer del lugar de administración una vez que el fármaco ha sido liberado, sin necesidad de ser retirado¹⁹⁷. La utilización del PLAGA para la preparación de microesferas de aciclovir ha dado resultados positivos en la cesión tanto *in vitro* como *in vivo* si bien sólo se ha conseguido la cesión del fármaco durante periodos de tiempo cortos¹⁹⁸.

¹⁹³ **Herrero-Vanrell R. y Refojo, M.F.** Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 52: 5-16 (2001).

¹⁹⁴ **Jalil, R. y Nixon, J.R.** Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactic-coglycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J. Microencapsul.*, 7: 297-325 (1990).

¹⁹⁵ **Sansdrap, P. y Mões, A.J.** Influence of additives on the release profile of nifedipine from poly (DL-lactide-coglycolide) microspheres. *J. Microencapsul.*, 15: 545-553 (1998).

¹⁹⁶ **Moritera, T., Ogura, Y., Honda, Y. y Wada, R.** Microspheres of biodegradable polymers as a drug delivery system in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1785-1790 (1991).

¹⁹⁷ **Shah, S.S., Cha, Y. y Pitt, C.G.** Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?. *J. Control. Release*, 18: 261-270 (1992).

¹⁹⁸ **Conti, B., Bucolo, C., Giannavola, C., Puglisi, G., Giunchedi, P. y Conte, U.** Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 5: 287-293 (1997).

- Los diseños experimentales son una herramienta muy útil y rápida para determinar el nivel óptimo de los factores experimentales requeridos para una respuesta dada¹⁹⁹. El uso de diseños experimentales está muy extendido para optimizar parámetros de ciertos procesos, especialmente para establecer las condiciones óptimas para obtener una determinada respuesta²⁰⁰. Se han aplicado, con éxito, en preparaciones farmacéuticas como son los sistemas particulares, entre los que se encuentran las microesferas.

- La esterilización por rayos gamma se utiliza habitualmente para productos sanitarios termolábiles. En el desarrollo galénico, una de las aplicaciones de esta radiación ionizante, es la esterilización de microesferas que vayan a ser destinadas para uso parenteral²⁰¹. Las ventajas de este tipo de esterilización para estas formulaciones (alto poder de penetración, baja reactividad química, bajos niveles de residuos, pequeños cambios de temperatura de la muestra y pocas variables para controlar) hacen que sea una técnica de elección frente a otros tipos de esterilización. No obstante, cada vez que se aplica a una nueva formulación es necesario estudiar sus efectos porque puede inducir cambios estructurales que pueden modificar la cesión del fármaco y por ello, la cantidad a administrar. Este hecho tiene una importancia especial en el caso de formulaciones para administración intraocular como las microesferas, debido a que la toxicidad local está relacionada con dicha cantidad.

¹⁹⁹ **Gotti, R., Furlanetto, S., Andrisano, V., Cavrini, V. y Pinzauti, S.** Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulphate. *J. Chromatogr. A*, 875: 411-422 (2000).

²⁰⁰ **McCarron, P.A., Woolfson, A.D y Keating, S.M.** Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 193: 37-47 (1999).

²⁰¹ **Sintzel, M.B., Merkli, A., Tabatabay, C., y Gurny, R.** Influence of irradiation sterilization on polymers used as a drug carriers - a review. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23: 857-879 (1997).

HIPÓTESIS

La administración intravítrea de microesferas biodegradables de aciclovir en una dosis única puede tener una ventaja significativa sobre otras vías de administración. Por una parte, la administración intravítrea de aciclovir ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de enfermedades herpéticas oculares que no responden al tratamiento sistémico, ya que se deposita directamente el fármaco en el lugar donde se produce la infección. Y por otra, la obtención de un sistema de liberación controlada, como las microesferas, permite la administración en dosis única reduciendo los efectos indeseables derivados de inyecciones intraoculares sucesivas.

La velocidad de liberación del fármaco a partir de estos sistemas se puede modular adicionando sustancias que modifiquen las características de las microesferas obtenidas. Asimismo, las características del polímero, biocompatible y biodegradable, son determinantes en cuanto a la bioeliminación que han de sufrir estos sistemas en un medio como el vítreo.

La optimización de una formulación biodegradable y biocompatible destinada a su administración por vía intravítrea, para el tratamiento de procesos infecciosos causados por el virus del herpes, debe ser capaz de ceder la sustancia activa a una velocidad suficiente para mantener niveles terapéuticos, con la mínima cantidad, durante el tiempo necesario para evitar recidivas. Asimismo, la formulación ha de poderse administrar fácilmente.

La formulación óptima ha de esterilizarse, sin que dicho proceso altere sus propiedades iniciales.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente comentados, el objetivo principal de este trabajo se ha centrado en el desarrollo de una formulación de liberación controlada, microesferas biodegradables de aciclovir, para su administración intravítrea en una dosis única, de un tamaño tal que sean fácilmente inyectables a través de una aguja de 27G, en un volumen de inyección convencional. Este objetivo global podría desglosarse en los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro*, de microesferas elaboradas a partir del copolímero láctico-glicólico (50:50), conteniendo aciclovir e incorporando aditivos de distinta naturaleza en las distintas fases de la emulsión, así como la selección del aditivo que mejore las características de la formulación con el fin de conseguir una formulación capaz de liberar aciclovir a una velocidad que pueda resultar útil para el tratamiento de enfermedades oculares herpéticas. Los resultados de este estudio se recogen en el artículo 1 titulado “*Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives*”.
2. Optimización de la formulación de microesferas de aciclovir con gelatina como aditivo mediante la aplicación de un diseño experimental con el fin de disminuir todo lo posible la cantidad de microesferas a administrar. Los resultados de este estudio se recogen en el artículo 2 titulado “*Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study*”.
3. Esterilización de la formulación seleccionada, para su posterior utilización *in vivo*, mediante radiación gamma a una dosis de 25 kGy: caracterización

de la misma antes y después del proceso de esterilización. Los resultados del cumplimiento de este objetivo se recogen en el artículo 3 titulado “*Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration*”.

Parte experimental

Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal
delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives

Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives

C. MARTÍNEZ-SANCHO, R. HERRERO-VANRELL and S. NEGRO*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

(Received 25 March 2003; revised 5 June 2003; accepted 23 June 2003)

Aciclovir (acycloguanosine) has been demonstrated to be effective in the treatment of intraocular pathologies such as herpes simplex virus reactiva and acute retinal necrosis. Although intravitreal injections have been used with fewer side-effects than intravenous administration, the risk of complications increases with the frequency of intravitreal injections. For this reason, a biodegradable drug-delivery system, such as microspheres, able to promote prolonged release of the drug, offers a good alternative to multiple intravitreal administrations. In this work, aciclovir-containing poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres were prepared by the solvent evaporation method. Several additives were incorporated in the microspheres to modulate the release rate of the drug: four non-fatty substances (polyethylene glycol 500, polyethylene glycol 1500, hydroxypropyl methylcellulose and gelatin) and four fatty substances (oleic acid, caprylic acid, stearic acid and lauric acid). Morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy. Gravimetric analysis showed that particles size distribution was significantly influenced by the incorporation of additives. Loading efficiency was also significantly influenced by the incorporation of additives. Release studies showed that fatty substances were able to modulate the release rate of the drug. Gravimetric analysis showed that particles size distribution was significantly influenced by the incorporation of additives.

Artículo 1

Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives

Keywords: Aciclovir, intravitreal, microspheres, PLGA, additives

Introduction

Aciclovir (acycloguanosine) is a synthetic analogue of purinic nucleosides with antiviral activity. It is a highly potent inhibitor of herpes simplex virus (HSV), types 1 and 2, and varicella zoster virus, and has extremely low toxicity for the

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: negro@farm.ucm.es

Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives

C. MARTÍNEZ-SANCHO, R. HERRERO-VANRELL and S. NEGRO*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

(Received 25 March 2003; revised 9 June 2003; accepted 23 June 2003)

Aciclovir (acicloguanosine) has been demonstrated to be effective in the treatment of intraocular pathologies such as herpes simplex virus retinitis and acute retinal necrosis. Although intravitreal injections have been used with fewer side-effects than intravenous administration, the risk of complications increases with the frequency of intravitreal injections. For this reason, a biodegradable drug-delivery system, such as microspheres, able to promote prolonged release of the drug, offers a good alternative to multiple intraocular administrations. In this work, aciclovir-containing poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres were prepared by the solvent evaporation method. Seven additives were incorporated in the microspheres to modulate the *in vitro* release rate of the drug: four non-fatty substances (polyethylene glycol 300, polyethylene glycol 1500, hydroxypropyl methylcellulose and gelatin) and three fatty substances (isopropyl myristate, vitamin E and Labrafil® M 1944 CS). Morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy. Granulometric analysis showed that particle size distribution was significantly influenced by the incorporation of additives. Loading efficiency decreased when fatty substances were added, whereas non-fatty additives promoted higher incorporation of the drug. Infrared and differential scanning calorimetry analyses indicated that microspheres prepared by the solvent evaporation process were not influenced by the type of additive used. In all cases, the initial burst resulted less than 5%. Additive-free microspheres showed a slow release within the first days, but when additives were incorporated, in general, the release rates of the drug were increased. Best release results were obtained for gelatin-containing microspheres. The release of aciclovir from these microspheres was adjusted to a zero-order kinetic from 1 to 49 days with a release constant of 1.13 µg/day/mg microspheres. A dose of 0.74 mg microspheres would be therapeutic for the herpes simplex and Epstein–Barr viruses (MIC 0.1 µg/ml) and 7.4 mg for varicella zoster virus (MIC 1 µg/ml) treatment in an animal model.

Keywords: Aciclovir, intraocular, microspheres, PLGA, additives.

Introduction

Aciclovir (acicloguanosine) is a synthetic analogue of purynic nucleosides with antiviral activity. It is a highly potent inhibitor of herpes simplex virus (HSV), types 1 and 2, and varicella zoster virus, and has extremely low toxicity for the

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: soneal@farm.ucm.es

normal host cells (Conti *et al.* 1997). The *in vitro* sensitivity of herpes viruses to aciclovir is dependent on strain and tissue culture conditions, but the majority of herpes simplex and Epstein-Barr viruses are inhibited by drug concentrations up to 0.1 µg/ml, while varicella zoster virus was inhibited by 1 µg/ml (Brigden and Whiteman 1985). In fact, some ocular pathologies such as HSV retinitis and acute retinal necrosis (ARN) are usually treated by administering intravenous or/and intravitreal aciclovir.

Intravitreal administration of aciclovir has been demonstrated to be more effective than intravenous administration. Nevertheless, due to its short vitreal half-life (2.98 h) (Hughes *et al.* 1996), it is necessary to administer several doses frequently to maintain therapeutic drug concentrations in the site of action. However, successive intraocular injections are poorly tolerated with risks such as endophthalmitis, cataract, retinal detachment and vitreal haemorrhage. This inconvenience could be overcome by developing drug-delivery systems able to promote prolonged release of the drug (Genta *et al.* 1997). For this purpose, drug-delivery systems such as microparticles are a good alternative, and when a biodegradable and biocompatible polymer is employed as a microparticle carrier, the system can be administered by the intravitreal route without surgical incision with minimal adverse effects on the ocular tissues. Furthermore, erodible devices disappear from the site of implantation once the drug has been released from it. Thus, microparticles can be injected through standard needles (18–27G). In fact, microparticles for intraocular administration have been under evaluation for ophthalmic drug-delivery purposes for the two past decades (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). These systems offer special advantages in the treatment of posterior segment diseases such as proliferative vitreoretinopathy, endophthalmitis, recurrent uveitis, ARN, cytomegalovirus retinitis and diabetic retinopathy.

The release rate of a drug included within a matrix system, such as microspheres, depends mainly on the physicochemical properties of the substance, the kind of polymer, the inner matrix structure and the microparticle size (Jalil and Nixon 1990, Herrero-Vanrell *et al.* 1998). Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a common, biodegradable medical polymer with a history of safe human usage in sutures, orthopaedics, bone plates and extended release pharmaceuticals (Cohen *et al.* 1991). Biological degradation of PLGA occurs primarily by hydrolysis and the degradation products are lactic and glycolic acids, which are further metabolized to carbon dioxide and water (Reed and Gilding 1981).

The objective of the current study was to identify potential formulation(s) that consisted of biodegradable microspheres loaded with aciclovir that would provide controlled and predictable release kinetics including a minimal burst effect and long-term release with the administration of a single intravitreal injection. Conti *et al.* (1997) prepared microspheres by the spray-drying technique, with several molecular weights of polylactic acid (PLA) and PLGA. In the case of PLGA microspheres, 100% of the drug was released *in vitro* in 8 h. Only PLA microparticles succeed in promoting the sustained release of the drug in the vitreal for 14 days. In previous studies carried out by the authors, PLGA microspheres loaded with aciclovir were prepared by the solvent evaporation technique from an o/w emulsion with a mean encapsulation efficiency of $62.80 \pm 9.04\%$, releasing the drug *in vitro* up to 49 days. Nevertheless, the release of aciclovir from the microspheres resulted practically negligible at the first stages.

It is well known that the incorporation of additives can modify the release rate of drugs (Sansdrap and Möes 1998). In the present study, several additives (fatty and non-fatty) were incorporated to modify the release of aciclovir from PLGA microspheres: fatty additives (vitamin E, isopropyl myristate and Labrafil®) and non-fatty additives (polyethylene glycol (PEG) 300, PEG 1500, hidroxypropyl methylcellulose (HPMC) and gelatin). All have been previously used in parenteral formulations. Also, HPMC (Gursoy and Cevik 2000) and gelatin (Chowdhury and Mitra 2000), which are viscosity-increasing agents, have been widely used in ophthalmic preparations, and vitamin E in the treatment of ophthalmic diseases (Brayfield 1999). In its turn, PEG was used as a channelling agent to improve the release rate of certain drugs from microspheres (Lalla and Sapna 1993, Khidr *et al.* 1998, Mallard *et al.* 2000a, b), isopropyl myristate to modify the release profiles of several drugs (Juni *et al.* 1985, Wang *et al.* 1996), and Labrafil® M 1944 CS, a non-ionic excipient, a widely used solubilizer and dispersing vehicle for pharmaceutical products (Gao *et al.* 1995).

In this work, microspheres were prepared from PLGA 50:50 polymer with the addition of fatty and non-fatty additives to provide a controlled release rate of aciclovir for up to 7 weeks. Formulations were prepared by the solvent evaporation method from an o/w emulsion. In each case, non-fatty additives were added to the external phase of the emulsion, while fatty additives were placed in the inner phase.

The microparticles were characterized and the drug-release profiles obtained with additives were compared with those obtained with microspheres prepared without additives. As an additional assay, injectability of microparticles was performed to evaluate their suitability for intravitreal injection.

Materials and methods

Materials

Aciclovir (9[2-(hydroxyethoxy)methyl]-guanine) was purchased from Reig Farma, S.A. (Spain). PLGA 50:50, with an inherent viscosity of 0.2 dl/g (Resomer® RG502), was supplied by Boehringer Ingelheim Chemicals Division (Ingelheim, Germany). Polyvinyl alcohol (PVA) MW 72 000 Dalton (Fluka Chemie AG, Germany), vitamin E (α -tocopherol) (Sigma Chemical Co., Spain), esters of PEG-6 apricot or almond oils (Labrafil® M 1944 CS) (Gatefossé, France), isopropyl myristate (Merck, Spain), PEG 300 (ICI, UK), PEG 1500 (Merck), HPMC (Sigma) and gelatin (Merck) were used as received.

Methylene chloride (CH_2Cl_2) and sodium hydroxide solution, analytical grade, were obtained from Merck. Distilled and deionized water (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) was used in the preparation of all buffers and solutions.

Preparation of biodegradable microspheres

Microparticle preparation was performed by the solvent evaporation technique from an o/w emulsion (Beck *et al.* 1979, Álvarez *et al.* 1998).

In all cases, the starting drug:polymer ratio was 1:10 (w/w), being the amount of polymer processed 400 mg. For all the additive-containing batches, the additive:polymer ratio was 2:10.

Briefly, the organic phase was prepared by dissolving the polymer in 1 ml CH_2Cl_2 using a vortex mixer (IKA Labortechnik, Germany) and then dispersing 40 mg aciclovir in the polymer solution. The aqueous phase consisted of 100 ml PVA solution (0.1%). The organic phase containing a suspension of the drug was slowly poured into the aqueous phase to form an emulsion, and the system was continuously stirred for 3 h at room temperature to allow complete evaporation of the organic solvent.

As previously cited, non-fatty additives were added to the external phase, whereas fatty additives were added to the internal phase. Upon evaporation of the organic solvent, the microspheres were vacuum filtered through a 5- μm filter, washed three times with water and lyophilized (Flexy-DryTM, FTS Systems, USA). The lyophilized formulations were kept in a dessicator until use.

Determination of the encapsulated aciclovir in the microspheres

A fixed weight of drug-loaded microspheres (10 mg) was dissolved in 1 ml CH_2Cl_2 . Aciclovir was extracted from CH_2Cl_2 three times with 9 ml sodium hydroxide solution (10^{-4} M). The mixture was centrifuged (Eba 12R, Hettich, Germany) at 6000g for 5 min and the supernatant filtered through a 0.45- μm syringe filter (Tracer, Spain). Drug quantitation was carried out measuring the absorbance of the extracted aqueous solutions at 254 nm (DU-6, Beckman, OH, USA). The total amount of aciclovir was calculated from the aliquots of each extract.

Morphological characterization

Microspheres samples were observed by light microscopy. The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6400, Tokyo, Japan). The samples were dried and gold sputter-coated before observation by SEM at 20 kV.

Granulometric analysis (mean diameter and size distribution) of each batch of microspheres was carried out with a Galai Cis-1 computerized inspection system (Galai Production Ltd, Israel) in the 0.5–150 μm range.

Injectability

Approximately 10 mg aciclovir-loaded microspheres were suspended in 1 ml saline solution. The injectability of this suspension was ascertained using a 2-ml syringe attached to a 27G needle. The maximum force needed to inject this suspension was determined in an Instron 4501 instrument (Instron Corporation, Canton, MA, USA).

Infrared absorption spectrophotometry (IR)

IR was performed on a Perkin-Elmer system 2000 FT-IR infrared spectrophotometer (Perkin-Elmer, UK) against air. Pressed discs were prepared using potassium bromide. IR spectra were recorded for aciclovir, PLGA and microspheres with and without additives.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed with a Mettler 820 DSC analyser (Mettler Toledo, Switzerland). For DSC measurements, aluminium pans were filled with samples of 5–10 mg and heated from 25 to 300°C at 10°C/min in a nitrogen atmosphere (flow rate 40 ml/min). In these conditions, DSC thermograms were performed for aciclovir, PLGA, non-loaded microspheres and microparticles with and without additives.

In vitro release studies

Samples of microspheres (10 mg) were suspended in 3 ml isotonic phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 (sink conditions), and placed in a water shaker bath (NE-5, Clifton, UK) at 37°C with a constant agitation (100 strokes/min). Periodically, the PBS was removed with a syringe, filtered through a 0.45-µm filter and the aciclovir concentration was determined by measuring the absorbance at 251 nm (no additive interfered with aciclovir). The same volume of fresh medium was replaced to continue the release study. The release assay was performed in duplicate for each batch ($n=3$).

After the release assay, microspheres were dried for 2 days in a vacuum dessicator and residual aciclovir was extracted and analysed as previously described.

Results and discussion

This work evaluated the effect of the addition of seven additives on the characteristics of the microspheres prepared from PLGA polymer. Table 1 shows the results obtained for the different batches in terms of mean yields of production, mean loading efficiencies and mean diameters of aciclovir microspheres. The mean yields of microspheres ranged from $52.72 \pm 4.40\%$ (isopropyl myristate microspheres) to $70.76 \pm 1.94\%$ (gelatin microspheres).

Preliminary studies carried out by the authors demonstrated that when non-fatty additives were incorporated in the organic phase, the loading efficiency decreased to a very low value. This fact was due to the inner channels formed by the non-fatty additives, which promote aciclovir release from the inmatures

Table 1. Yield of production, loading efficiency and diameter particle of microspheres batches.

Additive type	Yield of production (%) (mean \pm SD)	Loading efficiency (%) (mean \pm SD)	Diameter particle (µm) (mean \pm SD)
PEG 300	63.16 ± 1.25	65.10 ± 5.68	34.61 ± 11.37
PEG 1500	67.00 ± 7.84	64.63 ± 1.16	40.57 ± 10.75
HPMC	70.06 ± 2.17	69.60 ± 4.02	76.39 ± 15.31
Gelatin	70.76 ± 1.94	76.10 ± 3.37	29.64 ± 12.41
Vitamin E	54.33 ± 1.66	58.61 ± 0.77	31.31 ± 16.36
Labrafil®	59.51 ± 1.13	42.50 ± 0.27	80.78 ± 25.85
Isopropyl myristate	52.72 ± 4.40	37.63 ± 1.30	53.69 ± 29.45
Additive-free	57.00 ± 6.85	62.80 ± 9.04	43.82 ± 17.88

microspheres. For this reason, it was decided to incorporate the non-fatty additives to the external phase, as well as the fatty additives to the inner phase.

The loading efficiency decreased when fatty additives were added, ranging between $37.63 \pm 1.30\%$ (isopropyl myristate) and $58.61 \pm 0.77\%$ (vitamin E). On the contrary, non-fatty additives produced loading efficiencies higher than 60%. The highest value ($76.10 \pm 3.37\%$) was obtained for the microspheres with gelatin. This effect may be due to the positive charges of gelatin that created an acidic medium avoiding the release of aciclovir. In our case, higher payloads were advantageous because they allowed the minimization of the dose of microspheres to be administered intravitreally. This fact is important in the posterior segment where the turnover results slowed down, and the time of polymer biodegradation in this zone has been described as being slower than other sites with more enzymatic activity.

The particle size distribution of microspheres was significantly influenced by the incorporation of the additives. The mean diameter of microspheres varied from $29.64 \pm 12.41 \mu\text{m}$ (gelatin microspheres) to $80.78 \pm 25.85 \mu\text{m}$ (Labrafil® microspheres). Particles of diameters less than $106 \mu\text{m}$ can be considered suitable for intravitreal administration (Tice and Gilley 1985). For this reason, all microparticles obtained in this work could be considered suitable for this purpose.

The injectability of microspheres depends on their own properties, as well as the syringe, the needle size and the diluent properties. Practical experience within hospital settings and information provided by syringe/needle suppliers indicates that the application of an ejection force of maximum 12 Newtons over 10 s can be considered as a suitable development criteria to define the target for a minimum needle inner diameter. Microspheres with fatty additives showed inadequate injectability because they had a low dispersibility in saline solution with values of more than 12 N over 10 s, whereas the injectability of non-fatty microspheres was very good, and especially gelatin-loaded microspheres, whose injectability was found to be excellent (8.06 N), thus making them suitable for clinical use without suture.

Morphologically, SEM revealed that additive-free and non-fatty additive microspheres were spherical and possessed a smooth surface (figure 1). On the contrary, microspheres containing fatty additives appeared more agglomerated, tending to stick together due to a residual of the fatty component, which could remain in the microspheres surface.

IR spectra obtained for aciclovir and PLGA were concordant with their reference spectra. No modification of the PLGA spectrum was observed when blank microspheres were analysed. Additives did not interfere with PLGA in the proportion used in preparing microspheres. These facts indicated that no change took place in the polymer due to the microparticle manufacturing process.

The DSC profiles of PLGA (Alléman *et al.* 1998) and non-loaded microspheres showed a glass transition temperature (T_g) at 44.83°C , demonstrating that the residual traces of methylene chloride insignificantly affected the PLGA T_g in the microspheres without drug. In its turn, the DSC thermogram of aciclovir (figure 2) showed a broad endotherm in the range $75\text{--}125^\circ\text{C}$, corresponding to a loss of residual water and a narrow melting endotherm at 255.33°C . A small endothermic peak around 175°C was observed, probably due to the fusion of a morpous form of aciclovir because it was observed to have no weight loss. The thermal behaviour of the physical mixture of aciclovir and non-loaded microspheres showed a similar

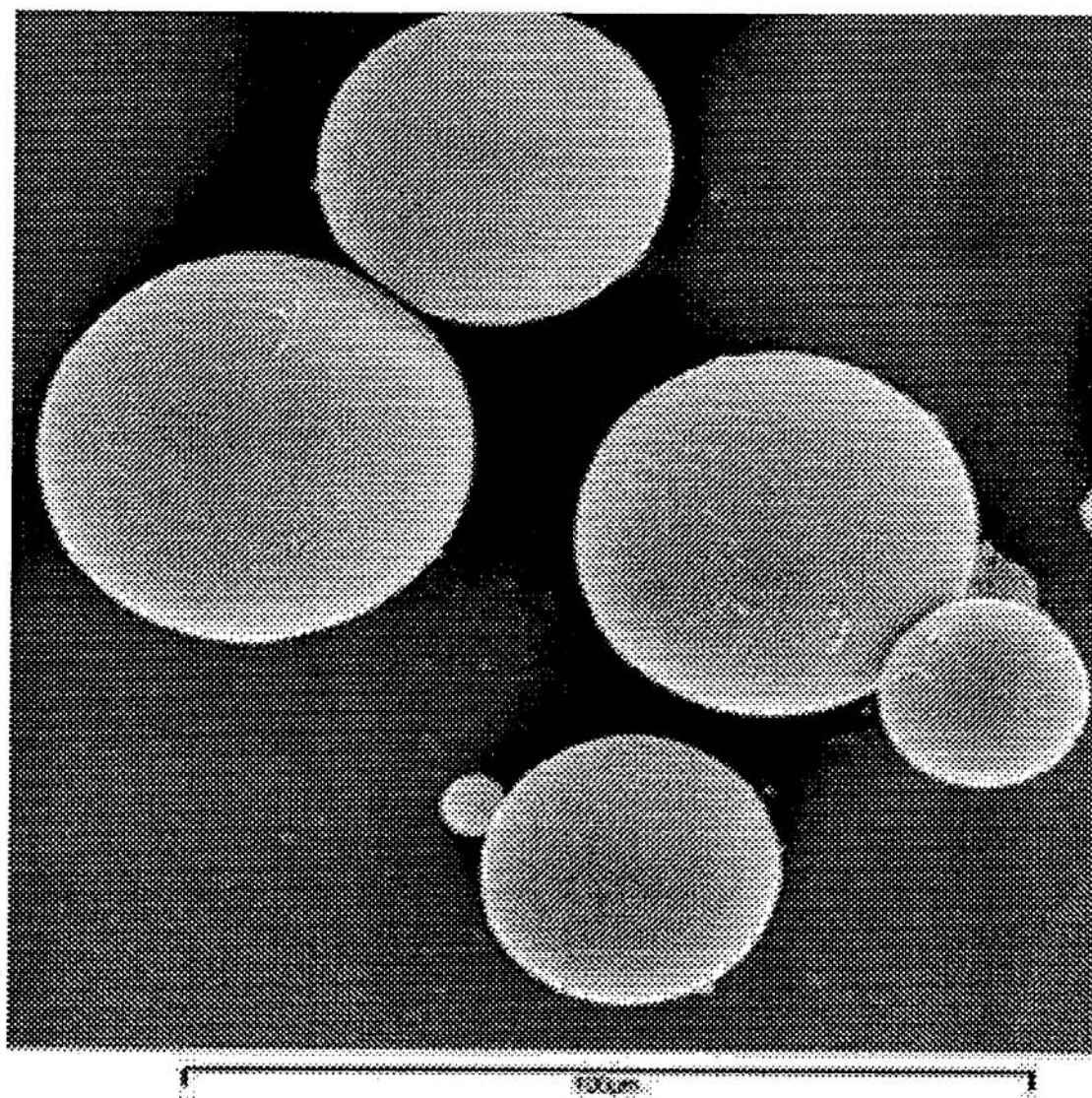


Figure 1. SEM photograph of gelatin microspheres.

profile as aciclovir-loaded microspheres, with a decrease of the aciclovir melting endotherm to 241.11°C, which was probably due to an interaction between the formulation components. Additives had no influence on the thermal behaviour of microspheres.

The aciclovir release profiles were compared with those obtained with additive-free microspheres (figures 3 and 4). Aciclovir was released from 50:50 PLGA microspheres for 49 days. Additive-free microspheres released a slight amount of drug ($3.28 \pm 0.36 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ microspheres) within the first 24 h of incubation, corresponding to drug diffusion out of the polymer matrix. This event was followed by a slow release of the drug for approximately 2 weeks ($4.39 \pm 0.38 \mu\text{g}/\text{day}/10 \text{ mg}$ microspheres). From that time and in agreement with polymer hydrolysis, a major drug release occurred. In any case, the amount of released drug was insufficient to achieve therapeutical levels.

When fatty additives were incorporated into the microspheres, the release profiles of the drug within the first 1–8 days were similar to those obtained for additive-free microspheres. Although addition of some fatty additives avoided diffusion of the drug through the microspheres within the first days (Herrero-Vanrell *et al.* 2000), it has been reported that the use of fatty substances

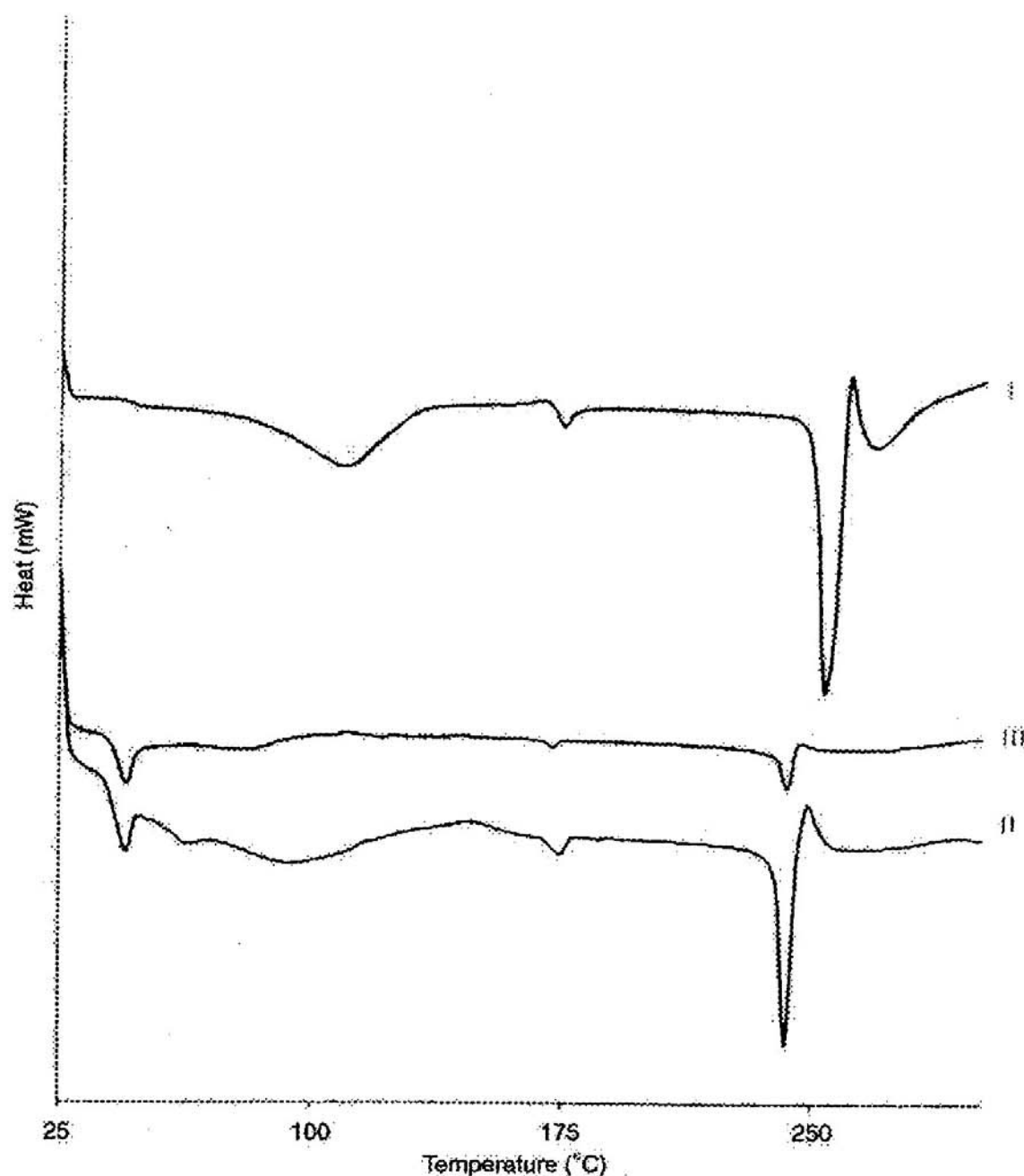


Figure 2. DSC thermograms of aciclovir (I), physical mixture of aciclovir and non-loaded microspheres (II) and aciclovir-loaded microspheres (III).

such as isopropyl myristate significantly increase the release rate of drugs from PLA microspheres (Juni *et al.* 1985, Wang *et al.* 1996). In our case and in agreement with Sansdrap and Möes (1998), it was observed that isopropyl myristate did not improve the release rate of aciclovir with respect to additive-free microspheres. On the contrary, the release behaviours of vitamin E and Labrafil® were similar: both improved the release of aciclovir from days 14 to 32.

When non-fatty additives were incorporated, the release rate of aciclovir was modified in all cases. For instance, HPMC addition, as opposed to the method of Gursøy and Cevik (2000), did not modify the aciclovir diffusion through the polymer matrix. The release profiles observed for PEG 300 and 1500 microspheres were common for both. Aciclovir was released faster from PEG (Khidr *et al.* 1998) than HPMC and additive-free microspheres within the firsts 28 days of the release assay.

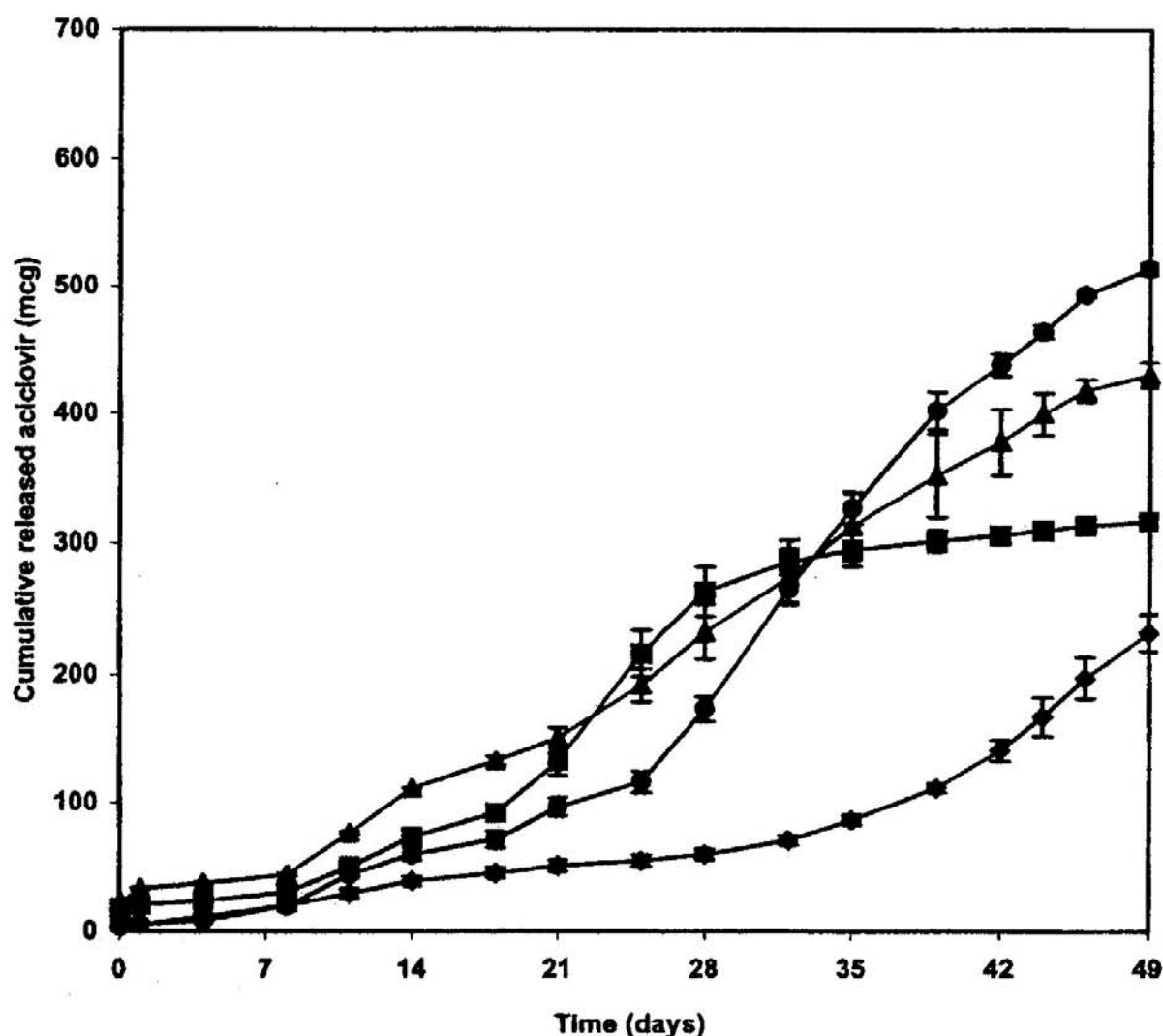


Figure 3. Aciclovir cumulative release profiles in 3 ml PBS from 10 mg microspheres with fatty additives and additive-free microspheres. ●, Additive-free microspheres: 571 µg aciclovir; ▲, vitamin E microspheres: 451 µg; ■, Labrafil® microspheres: 327 µg; ◆, isopropyl myristate microspheres: 289 µg.

The best results were obtained for gelatin microspheres, which showed a faster release profile from the first day of the assay (figure 4). For that reason, this formulation was selected for further studies. To determine the model that represented a best fit for the release of aciclovir from gelatin microspheres, the experimental data were analysed using the exponential equation proposed by Ritger and Peppas (1987) to describe the general solute release behaviour from spheres: $M_t/M_\infty = K \cdot t^n$, where M_t/M_∞ is the fraction of dose released at time t , K is the kinetic constant and n is the diffusional exponent. In the case of gelatin-loaded microspheres, n was 1.1, which indicates that the release of aciclovir from these microspheres follows a near zero-order release kinetic.

The zero-order kinetic constant calculated from 1 to 49 days ($r=0.991$) resulted in 1.13 µg/day/mg microspheres. According to these results and knowing the vitreous distribution volume in rabbits (1.5 ml), the vitreous elimination half-life of the drug (2.98 h), and the *in vitro* sensitivity of HSV and Epstein-Barr viruses to aciclovir (0.1 µg/ml) and of varicella zoster virus (1 µg/ml), it could be estimated that 0.74 and 7.4 mg of gelatin PLGA microspheres loaded with aciclovir, respectively, could deliver an adequate amount of the drug in a single

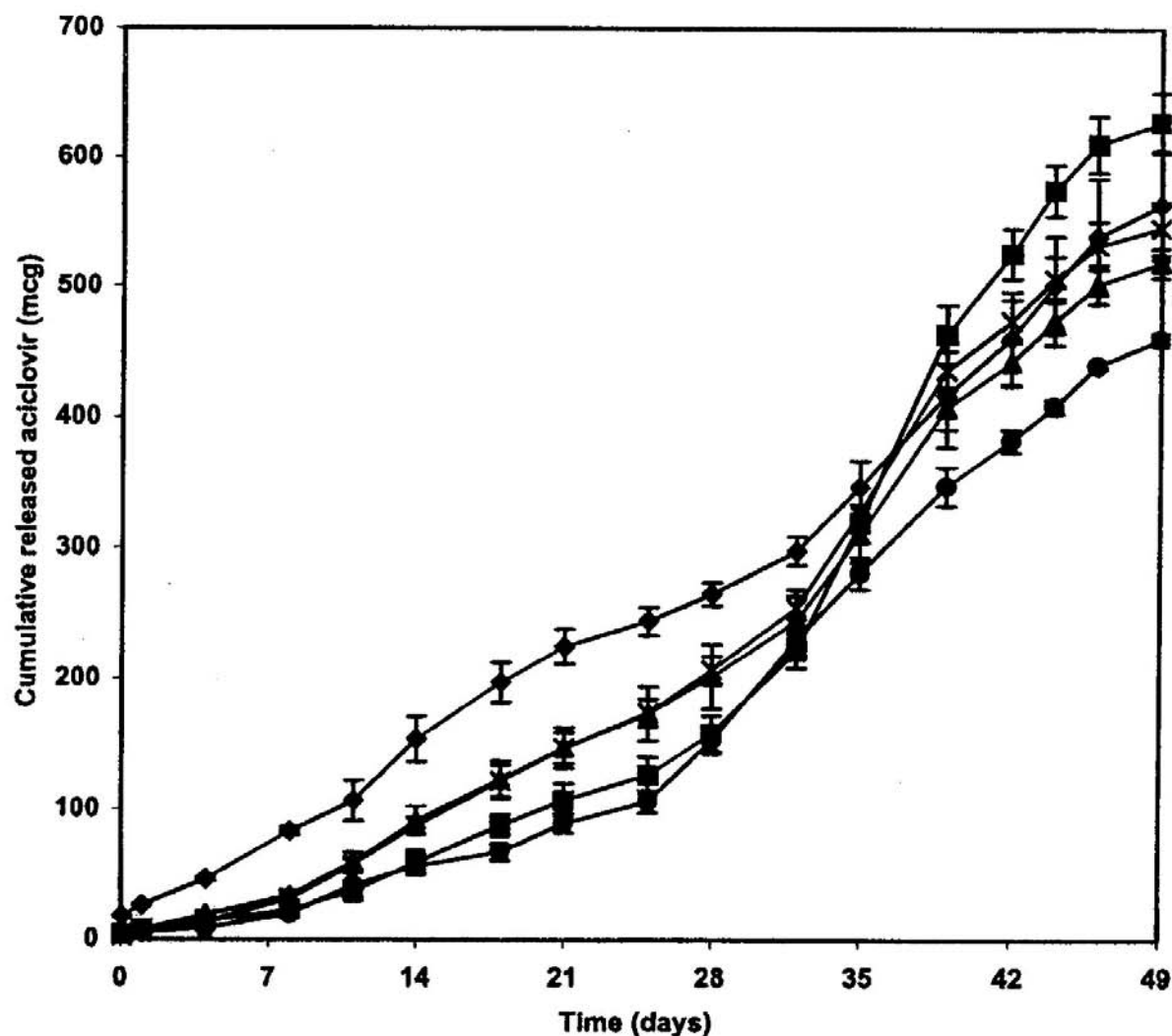


Figure 4. Aciclovir cumulative release profiles in 3 ml PBS from 10 mg microspheres with non-fatty additives and additive-free microspheres. ◆, Gelatin microspheres: 692 μ g aciclovir; ■, HPMC microspheres: 633 μ g; X PEG 300 microspheres: 592 μ g; ▲, PEG 1500 microspheres: 587 μ g; ●, additive-free microspheres: 571 μ g.

injection into the vitreous of an animal model, which is in the therapeutical level at least 49 days.

Conclusions

The solvent evaporation method described in this study was appropriate for the encapsulation of aciclovir. The particle size distribution of microspheres was significantly influenced by the incorporation of additives. SEM revealed that microspheres were spherical and possessed a smooth surface. Loading efficiency decreased, in general, when fatty substances were added. Microspheres generated a continuous release pattern for 49 days in PBS, pH 7.4. This long-term release was enhanced within the first days when seven different additives were added. When comparing the studied parameters—the mean yield of microspheres ($70.76 \pm 1.94\%$), the mean diameter of microspheres ($< 50 \mu\text{m}$) and the mean percentage of incorporated aciclovir ($76.10 \pm 3.37\%$)—with the release profile,

the best results were obtained for microspheres prepared with gelatin. Gelatin PLGA microspheres loaded with aciclovir provided *in vitro* constant release rate of the drug/(1.137 µg/day/mg microspheres) for 49 days. Injectability was excellent for these microparticles. This formulation is suitable for intraocular injection in an animal model.

Acknowledgements

This work was supported by a Complutense Investigation Project (SN) PR 52/00-8899. The authors thank Alfonso Rodríguez for technical SEM assistance.

References

- ALLÈMAN, E., GURNY, R. and LEROUX J.-C., 1998, Biodegradable nanoparticles of PLA and PLGA for parenteral administration. In H. A. Lieberman, M. M. Rieger and G. S. Banker (eds), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, 2nd edn (New York: Marcel Dekker).
- ÁLVAREZ, C., HERRERO-VANRELL, R., NEGRO, S., MOLINA, I. T., HERNÁNDEZ, M. T., PASTORIZA, P. and BARCIA, E., 1998, Dexametasone microspheres for intravitreal administration. In *3rd Spanish Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery*, p. 83.
- BECK, L. R., COWSAR, D. R., LEWIS, D. H., COSGROVE, R. J., RIDDLE, C. T., LOWRY, S. L. and EPPERLY, T., 1979, A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertility and Sterility*, **31**, 545–548.
- BRAYFIELD, A., 1999, *Martindale*, 32nd edn (London: Pharmaceutical Press).
- BRIGDEN, D. and WHITEMAN, P., 1985, The clinical pharmacology of acyclovir and its prodrugs. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplementum*, **47**, 33–39.
- CHOWDHURY, D. K. and MITRA, A. K., 2000, Kinetics of a model nucleoside (guanosine) release from biodegradable poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres: a delivery system for long-term intraocular delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, **5**, 279–285.
- COHEN, S., YOSHIKAWA, T. and LUCARELLI, M., 1991, Controlled delivery system for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharmaceutical Research*, **8**, 713–720.
- CONTI, B., BUCOLO, C., GIANNAVOLA, C., PUGLISI, G., GIUNCHEDI, P. and CONTE, U., 1997, Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: *in vitro*/*in vivo* evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **5**, 287–293.
- GAO, Z., SHUKLA, A. J., JOHNSON, J. R. and CROWLEY, W. R., 1995, Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations: *in vitro* evaluation. *Pharmaceutical Research*, **12**, 857–863.
- GENTA, I., CONTI, B., PERUGINI, P., PAVANETTO, F., SPADARO, A. and PUGLISI, G., 1997, Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49**, 737–742.
- GURSOY, A. and CEVIK, S., 2000, Sustained release properties of alginate microspheres and tabletted microspheres of diclofenac sodium. *Journal of Microencapsulation*, **17**, 565–575.
- HERRERO-VANRELL, R. and REFOJO, M. F., 2001, Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **52**, 5–16.
- HERRERO-VANRELL, R., BARCIA, E., NEGRO, S. and REFOJO, M. F., 1998, Development of ganciclovir microspheres from poly (D,L-lactic-co-glycolide) acid for the treatment of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *STP Pharma Sciences*, **8**, 237–240.

- HERRERO-VANRELL, R., RAMIREZ, L., FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A. and REFOJO, M. F., 2000, Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, *in vitro* release profiles, and sterilization process. *Pharmaceutical Research*, **17**, 1323–1328.
- HUGHES, P. M., KRISHNAMOORTHY, R. and MITRA, A. K., 1996, Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdialysis technique. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **12**, 209–224.
- JALIL, R. and NIXON, J. R., 1990, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactic-coglycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*, **7**, 297–325.
- JUNI, K., OGATA, J., MATSUI, N., KUBOTA, M. and NAKANO, M., 1985, Controlled release rate of bleomycin from poly(lactic) acid microspheres by additives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 1609–1614.
- KHIDR, S. H., NIAZY, E. M. and EL-SAYED, M., 1998, Development and in-vitro evaluation of sustained-release meclofenamic acid microspheres. *Journal of Microencapsulation*, **15**, 153–162.
- LALLA, J. K. and SAPNA, K., 1993, Biodegradable microspheres of poly (DL-lactic acid) containing piroxicam as a model drug for controlled release via the parenteral route. *Journal of Microencapsulation*, **10**, 449–460.
- MALLARD, C., COUDANE, J., RAULT, I. and VERT, M., 2000a, *In vitro* delivery of a sparingly water soluble compound from PLA 50 microparticles. *Journal of Microencapsulation*, **17**, 13–28.
- MALLARD, C., COUDANE, J., RAULT, I. and VERT, M., 2000b, The use of additives to modulate the release of a sparingly water soluble drug entrapped in PLA 50 microspheres. *Journal of Microencapsulation*, **17**, 81–93.
- REED, A. M. and GILDING, D. K., 1981, Biodegradable polymers for use in surgery, Poly(glycolic)/poly (lactic acid) homo and copolymers: 2. *In vitro* degradation. *Polymer*, **22**, 494–498.
- RITGER, P. L. and PEPPAS, N. A., 1987, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, **5**, 23–36.
- SANSDRAP, P. and MÖES, A. J., 1998, Influence of additives on the release profile of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, **15**, 545–553.
- TICE, T. R. and GILLEY, R. M., 1985, Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. *Journal of Controlled Release*, **2**, 343–352.
- WANG, Y. M., SATO, H., ADACHI, I. and HORIKOSHI, I., 1996, Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for targeted delivery of a novel anticancer agent, taxol. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **44**, 1935–1940.

**Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres
for intravitreal administration using a factorial design study**

C. Martínez-Sánchez, R. Herrero-Vanrell, S. Negro

Acedado para publicación en el International Journal of Pharmaceutics

Artículo 2

**Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres
for intravitreal administration using a factorial design study**

Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study

C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro

Aceptado para publicación en el International Journal of Pharmaceutics

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Pharmaceutics xxx (2004) xxx–xxx

international
journal of
pharmaceuticswww.elsevier.com/locate/ijpharm

Optimisation of aciclovir poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study

C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro*

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

Received 1 August 2003; received in revised form 13 November 2003; accepted 12 December 2003

Abstract

The purpose of this work was to obtain an optimised long-term aciclovir PLGA microspheres formulation for intravitreal administration to minimise, as much as possible, the dose of microspheres to be administered with a suitable particle size for its injection through a 27G needle in a single dose. Microspheres were prepared by the solvent evaporation method. To obtain the optimum formulation a two-factor five-level central rotatable composite $2^2 + \text{star}$ design was employed. The independent variables were aciclovir and gelatin (added to the external phase of the emulsion). The dependent variables were the yield of production (%), the encapsulation efficiency (%), the initial burst release (%), the cumulative amount released from 1 to 14 days and the amount of aciclovir at the end of the release assay (μg aciclovir/mg microspheres). The best formulation according to the studied variables was (0,0), prepared with 80 mg of aciclovir and 80 mg of gelatin. This formulation showed good yield of production ($70.14 \pm 3.72\%$) and encapsulation efficiency ($70.77 \pm 2.62\%$), and released the drug at a constant rate for 63 days with a mean release constant of $1.73 \pm 0.08 \mu\text{g/day per mg microspheres}$. The selected formulation reduces a 40% the dose of microspheres to be administered through a 27G needle with respect to previous studies.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aciclovir; PLGA; Microspheres; Experimental design; Controlled release; Gelatin

1. Introduction

Response surface methodology (RSM) is a rapid technique used to empirically derive a functional relationship between an experimental response and a set of input variables. RSM reduces the number of experimental runs that are necessary to establish a mathematical trend in the experimental design region allowing to determine the optimum level of experimental

factors required for a given response. Thus, a screening phase that allows the key factors to be established is advisable (Gotti et al., 2000).

RSM is widely used to optimise process parameters, especially in determining optimum conditions for investigations and maximising yields in large-scale chemical synthesis (McCarron et al., 1999). It has been applied to pharmaceutical systems such as the preparation of particulate carriers as microspheres. Particles present obvious advantages for the administration of drugs. However, it is necessary to have a clear understanding of how preparation conditions determine particle characteristics and in particular, how these char-

* Corresponding author. Tel.: +34-91-3941739;
fax: +34-91-3941736.

E-mail address: soneal@farm.ucm.es (S. Negro).

acteristics are influenced by potential interactions between preparation factors. RSM may provide an useful tool to analyse such interactions.

Especially, micro- and nanoparticles are widely investigated for the controlled release of classical drugs as well as peptides and proteins. They can be made of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA), a biodegradable and biocompatible polymer with the advantage of being degraded and eliminated from the body once it has achieved its goal. This polymer has been used for the preparation of these particulate systems, sustained release preparations, implants and inserts for their administration through parenteral, oral, dermatological, pulmonary, nasal and ocular routes (Vandervoort and Ludwig, 2002).

Intravitreal administration of aciclovir has demonstrated to be more effective than intravenous administration for the treatment of some ocular pathologies such as herpes simplex virus retinitis and acute retinal necrosis, a virus infection characterised by necrosis of retinal cells that can lead to irreversible blindness. Nevertheless, due to its short vitreous half-life (2.98 h) (Hughes et al., 1996) it is necessary to administer relative high doses with the disadvantage of the side effects or to administer several doses frequently to maintain therapeutic drug concentrations in the site of action. But successive intraocular injections are poorly tolerated with risks such as endophthalmitis, cataract, retinal detachment and vitreous haemorrhage. These inconveniences could be overcome by the use of drug-delivery systems able to promote prolonged release of the drug into the vitreous cavity such as biodegradable microspheres. Microspheres, however, would constitute a poor delivery device if the release control of the core material were impossible. By modifying the microspheres preparation parameters, it is possible to exert control on the *in vitro* release profile. Thus, in a previous study carried out by the authors, aciclovir-containing PLGA microspheres (1:10 drug:polymer ratio) with several additives were prepared by the solvent evaporation method to identify a potential microspheres formulation which would provide controlled and predictable release kinetics including a minimal burst effect and a long-term release by the administration of a single intravitreal injection with the minimum dose of microspheres. The best results were obtained when gelatin, as the stabiliser agent, was incorporated in the

preparation of microspheres. The release constant of aciclovir from these microspheres was 1.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ per day microspheres for 49 days, a period of time longer than 14 days obtained by Conti et al. (1997). It was estimated that an amount of 0.74 mg of microspheres would be enough for the treatment of herpes simplex and Epsteins–Barr infections, and 7.4 mg for varicella zoster infections (Martínez-Sancho et al., 2003).

On this basis, when microspheres are prepared for the administration of a drug in a practically isolated zone as the vitreous, release must allow to reach therapeutical levels with the minimum dose. Moreover, the size of microspheres has to be adequate for its injection through a suitable needle. Thus, the objective of the current study was to optimise a microspheres formulation for intravitreal administration in order to minimise as much as possible the dose of microspheres to be administered with a suitable particle size for its injection through a 27G needle in a single dose. For this purpose, a central rotatable composite 2^2 + star experimental design was applied where two variables, aciclovir and gelatin, were studied. Aciclovir was chosen because it influences on the incorporated amount into the microspheres and the amount of microspheres to be administered, and gelatin because improved the release rate of aciclovir from PLGA microspheres when added to the external phase of the emulsion. The amount of aciclovir included in formulations ranged from 40 to 120 mg and gelatin from 9.5 to 150.5 mg, according to the experimental design. The studied responses, in all formulations, were the yield of production, encapsulation efficiency, initial burst release, aciclovir released from 1 to 14 days and at the end of the assay (73 days).

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

A two-factor, five-level central rotatable composite design 2^2 + star (Cochran and Cox, 1957) was used for the optimisation procedure. This design is suitable for the exploration of quadratic response surfaces and constructs a second order polynomial model, thus helping in optimising a process using a small number of experimental runs. The design consists of two replicated centre points and the set of points lying at the

Table 1
Variables and level of variation 2^2 + star design

Level of variation	Aciclovir (mg)	Gelatin (mg)
Independent variables		
–1.414	40	9.5
–1	51.6	30
0	80	80
1	108.4	130
1.414	120	150.5
Dependent variables		
Y_1 : yield of production (%)		
Y_2 : encapsulation efficiency (%)		
Y_3 : initial burst release (%)		
Y_4 : cumulative amount of aciclovir released from 1 to 14 days ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microspheres)		
Y_5 : cumulative amount of aciclovir released at the end of the assay ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microspheres)		

midpoints of each edge of the multidimensional cube that define the region of interest. A rotatable design puts the star points on a circle around the centre of the design, giving equal predictive power in all directions. The studied factors were aciclovir and gelatin. The different formulations of the design consisted of all possible combinations of the factors at all levels and were conducted in a fully randomised order. The independent factors and measured responses are listed in Table 1. The replicate design number was 2 with a total of 30 experiments.

2.2. Materials

Aciclovir (acicloguanosine, 9[2-(hydroxyethoxy)methyl]-guanine) was supplied by Reig Farma, S.A. (Madrid, Spain). PLGA 50:50 (Resomer[®] RG502, inherent viscosity 0.2 dL/g, weight-average molecular weight M_w 15,000 Da) was purchased from Boehringer Ingelheim Chemicals Division (Ingelheim, Germany). Polyvinyl alcohol (PVA) 72,000 M_w and gelatin (type A, 100–120 bloom) were obtained from Fluka Chemie AG (Germany) and Merck (Spain), respectively.

Dichloromethane (CH_2Cl_2) and sodium hydroxide solution, analytical grade, were provided by Merck (Barcelona, Spain).

2.3. Preparation of microspheres

Microspheres were obtained by the O/W emulsion solvent evaporation technique (Beck et al., 1979; Martínez-Sancho et al., 2003).

Briefly, 400 mg of PLGA were dissolved in 1 ml CH_2Cl_2 by vortex mixing. The appropriate amount of aciclovir according to the experimental design (40–120 mg, with respect to a drug:polymer ratio from 1:10 to 3:10) was suspended in the organic solution with a vortex mixer (IKA Labortechnik, Germany). The aqueous phase consisted of a 0.1% PVA solution, including the respective amounts of gelatin (9.5–150.5 mg). The solution was prepared by dispersing gelatin in approximately 10 ml of cold 0.1% PVA, allowing the gelatin particles to swell, and afterwards heating the dispersion to 50 °C under magnetic stirring. Then, this gelatin solution was added to 0.1% PVA to complete volume (100 ml). The inner phase was slowly poured into the aqueous phase, and the solvent evaporation step was performed by continuous stirring for 3 h under room temperature. After evaporation of methylene chloride, microspheres were vacuum-filtered through a 5 μm filter, washed three times with water and freeze-dried. All formulations were kept in a dessicator until use.

2.4. Morphological characterisation

Microspheres morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6400, Tokyo, Japan). The dried samples were gold sputter-coated before observation by SEM at 20 kV.

Granulometric analysis of each batch of microspheres was performed with a Galai Cis-1 computerised inspection system (Galai Production Ltd., Israel) in the 0.5–150 μm range.

2.5. Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed with a Mettler 820 DSC analyser (Mettler Toledo, Switzerland). Samples (5–10 mg) were heated from 25 to 300 °C at a heating rate 10°/min in nitrogen atmosphere (flow rate 40 ml/min).

2.6. Injectability

Aciclovir microspheres (10 mg) were suspended in 1 ml of saline solution. Maximum force needed to inject this suspension using a 2 ml syringe attached to a 27G needle was determined in an Instron 4501 instrument (Instron Corporation, Canton, MA).

2.7. Encapsulation efficiency

Encapsulated aciclovir was determined by dissolving the freeze-dried microspheres (10 mg) in 1 ml of CH_2Cl_2 and the drug was extracted with 9 ml of a 10^{-4} M sodium hydroxide solution by vortex mixing for 3 min, three times. The mixtures were centrifuged at $6000 \times g$ for 5 min and the extracted aqueous solutions were filtered through a 0.45- μm syringe filter (Tracer, Spain). The aciclovir content in the PLGA microspheres was determined spectrophotometrically at 254 nm (DU-6, Beckman, OH). The components of the microspheres did not interfere with aciclovir at this wavelength. The total amount of aciclovir was calculated from the aliquots of each extract.

2.8. In vitro release studies

In vitro drug release profiles were obtained by incubating the microspheres (10 mg) in 3 ml (sink conditions) of isotonic phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 under continuous shaking (100 strokes per minute) in a water bath (NE-5, Clifton, UK) at 37°C . At regular time intervals, the PBS was removed, filtered through a 0.45 μm filter and aciclovir was quantified spectrophotometrically at 251 nm (microspheres components did not interfere with aciclovir). The same volume of fresh PBS was replaced to continue the release study. All the experiences were performed in duplicate from each batch.

2.9. Statistical analysis

The experimental data were analysed by the response surface regression procedure with a lack of fit option to fit the second-order polynomial equation:

$$y_u = \beta_0 + \beta_1 x_{1u} + \beta_2 x_{2u} + \beta_{11} x_{1u}^2 + \beta_{22} x_{2u}^2 + \beta_{12} x_{1u} x_{2u} + e_u$$

where y_u is the measured response, β_0 , β_1 and β_2 are the regression coefficients, x_{1u} , x_{2u} are the studied factors and e is the error term.

The statistical analysis of the obtained results has been done by the corresponding analysis of variances of the selected experimental design, in order to determine the regression significance, its adjust to the model and the significance of the coefficients of the polynomial terms. This statistical study has been done by the Statgraphics Plus 4.0® (John Wiley and sons, New York).

The agreement between the predicted and the experimental values was determined by bias. Bias was calculated using the equation:

$$\left[\frac{\text{predicted value} - \text{experimental value}}{\text{predicted value}} \right] \times 100$$

3. Results and discussion

The objective of the present study was to optimise a formulation of biodegradable microspheres loaded with aciclovir to improve the release rate of the drug. The studied variables were aciclovir and gelatin. Aciclovir was chosen in order to minimise the amount of microspheres to be administered, and, based on previous studies carried out by the authors, gelatin was selected from several additives (fatty and non-fatty) because it provided an improvement of the in vitro release rate of aciclovir from PLGA microspheres.

In this work, morphologically, SEM revealed that all microspheres obtained from the experimental design resulted in spherical shapes and possessed a smooth surface (Fig. 1). The particle size is an important microsphere property, as it can influence the biopharmaceutical properties of the particle preparations. The particle size of microspheres was not significantly influenced by the amount of aciclovir and gelatin. The mean particle size of microspheres prepared from the formulations was $42.36 \pm 15.56 \mu\text{m}$, being considered suitable for intravitreal administration through a 27G needle (inner diameter 0.19 mm).

DSC measurements showed the same thermal behaviour in all microspheres. The PLGA T_g value (44.67°C) and the aciclovir melting endotherm (242°C) remained located practically at the same temperatures for all the microspheres formulations.

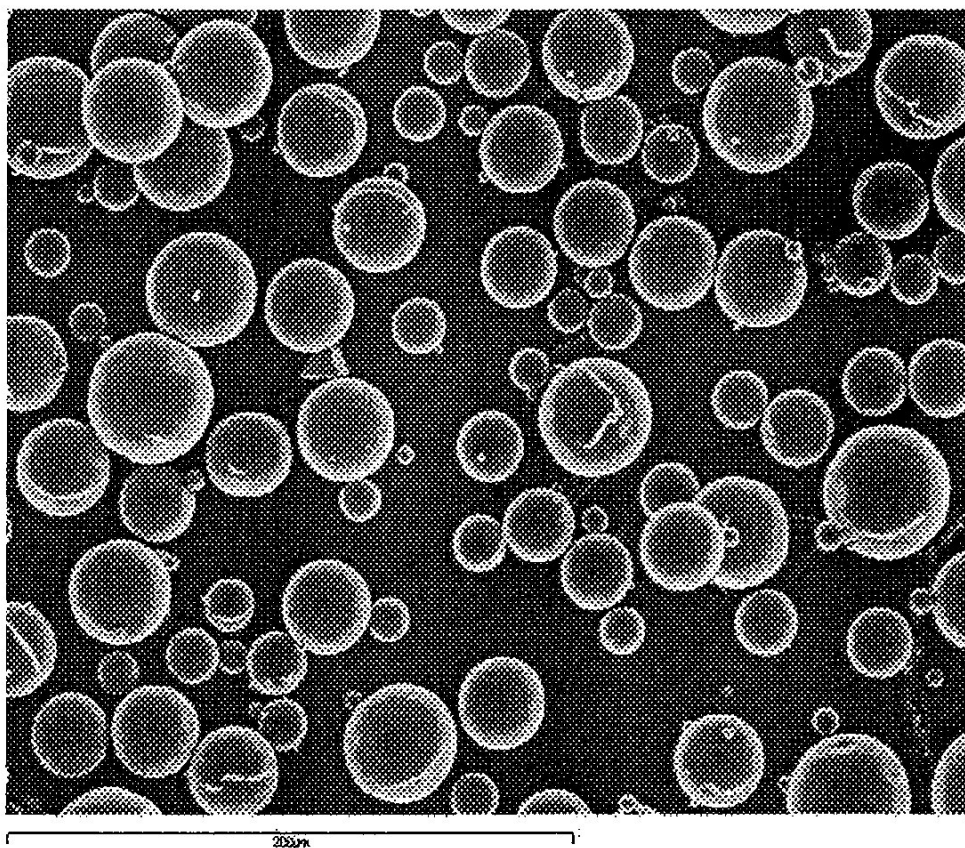


Fig. 1. SEM photograph showing the spherical shapes and smooth surfaces of microspheres.

The thermograms also showed a broad endotherm in the range 75–125 °C corresponding to a loss of residual water and a small endothermic peak around 175 °C probably due to the fusion of a morpous form of aciclovir. As an example, the thermogram of the formulation prepared with 80 mg of aciclovir and 80 mg of gelatin (0,0) of the experimental design, is shown in Fig. 2.

The results obtained for the measured responses of the experimental design and two replicates (mean values \pm S.D.) are listed in Table 2.

The yields of microparticles (Y_1) were up to 50% (most of formulations had yields of more than 60%), which reflects a good efficiency of the preparation method. This response was significantly affected by the amount of aciclovir employed in the microspheres preparation ($P < 0.05$). The yields of microspheres lower to 60% corresponded to those formulations prepared with amounts of aciclovir related to a drug:polymer ratio higher than 2.7:10, which is logical because these formulations have a high solute ratio promoting the precipitation of

Table 2

Observed experimental data for the design and two replicates (mean values \pm S.D.) of the responses for the design $2^2 + \text{star}$

Formulation	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1 (–1,–1)	66.18 \pm 1.46	49.02 \pm 1.79	3.79 \pm 0.85	3.38 \pm 0.28	54.96 \pm 1.42
2 (1,–1)	60.03 \pm 3.59	17.61 \pm 1.50	3.44 \pm 0.16	3.28 \pm 0.10	38.06 \pm 1.11
3 (–1,1)	63.58 \pm 2.51	60.30 \pm 1.12	2.17 \pm 0.60	4.62 \pm 0.62	69.56 \pm 0.87
4 (1,1)	56.88 \pm 4.15	23.88 \pm 0.45	8.69 \pm 0.02	6.53 \pm 0.54	51.50 \pm 0.81
5 (–1.4,0)	67.36 \pm 1.84	70.83 \pm 1.71	1.28 \pm 1.32	13.56 \pm 1.61	64.23 \pm 1.45
6 (1.4,0)	58.98 \pm 0.95	18.24 \pm 1.15	9.82 \pm 1.26	11.46 \pm 1.25	41.66 \pm 2.89
7 (0,–1.4)	63.10 \pm 2.69	44.32 \pm 2.62	7.07 \pm 3.20	6.48 \pm 0.28	73.00 \pm 3.81
8 (0,1.4)	62.57 \pm 2.22	47.04 \pm 1.59	7.44 \pm 0.98	13.24 \pm 0.80	79.40 \pm 2.82
9 (0,0)	71.94 \pm 3.47	71.40 \pm 2.97	4.56 \pm 0.44	32.72 \pm 1.65	117.63 \pm 4.31
10 (0,0)	68.34 \pm 3.60	70.13 \pm 2.66	6.45 \pm 1.00	26.96 \pm 3.11	118.83 \pm 4.63

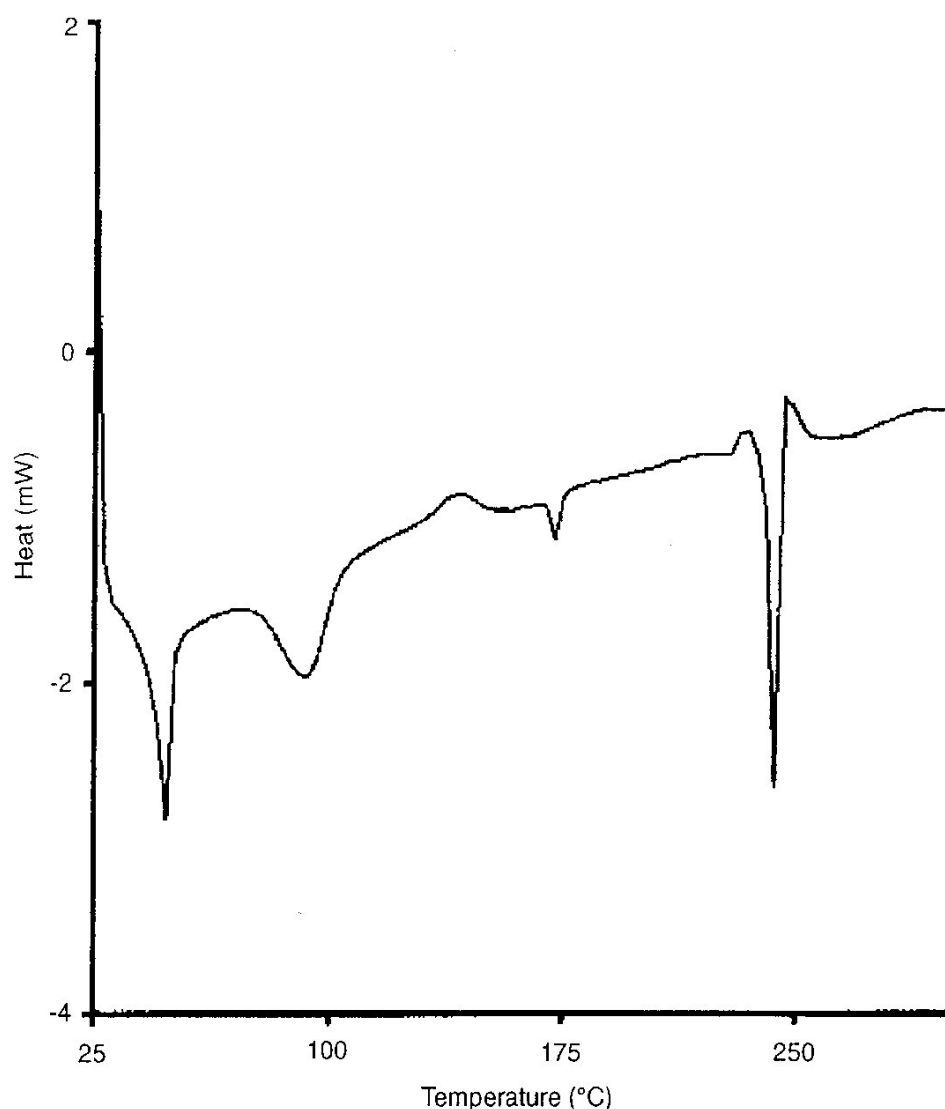


Fig. 2. DSC thermogram of aciclovir PLGA microspheres formulation (0,0).

the polymer which leads to a low yield of production.

The values for encapsulation efficiency of aciclovir in PLGA microspheres (Y_2) ranged between $17.62 \pm 1.51\%$ and $70.77 \pm 2.62\%$, and were significantly influenced ($P < 0.05$) by the two studied factors (aciclovir and gelatin). Very low encapsulation efficiency values were observed for those formulations which incorporated an aciclovir:polymer ratio higher than 2:10, this was probably due to the fact that during the microspheres preparation process a suspension is formed (aciclovir is not soluble in methylene chloride) whose stability decreases when a high proportion of drug was incorporated, decreasing the percentage of aciclovir incorporated into the microspheres. The obtained values for this parameter (Y_2) were fitted to the selected model ($R = 0.96$), according to the fol-

lowing equation: $Y_2 = 70.76 - 17.77X_1 + 2.67X_2 - 14.96X_1^2 - 14.39X_2^2 - 1.25X_1X_2$, being the coefficient term which reflects the interaction between the variables (X_1 and X_2), not significantly different from zero. Optimum formulation for this response corresponded to $(-0.60, 0.12)$.

Optimum microspheres formulation was selected considering not only the yield of production and encapsulation efficiency, but also the drug release characteristics including the initial burst. Tzafriri (2000) assumed that the total drug release is supplied by two uncoupled pools, one pool of fast drug diffusion (responsible from the burst), and another pool of slow diffusion drug controlled by polymer degradation. The relative dominance between diffusion and erosion plays a major role in the release kinetics. In particular, the velocity of erosion, the effective dif-

fusion coefficient of the drug molecule in the wetted polymer, the average pore length, and the initial pore diameter are sensitive parameters, whereas the porosity and the effective diffusion coefficient of the drug in the solvent-filled pores are seen to have little influence, if any, on the release kinetics (Lemaire et al., 2003).

The initial burst release is sometimes attributed to the rapid release by diffusion of dissolved drug initially deposited inside the pores. The most commonly supported hypothesis for the explanation of the burst is that some drug particles could have migrated at the surface during the drying of microspheres (Cohen et al., 1991). In this work, the percentage of initial burst release (Y_3) for all formulations was low, ranging between $1.28 \pm 1.32\%$ and $9.82 \pm 1.26\%$ of formulations $(-1.4,0)$ and $(1.4,0)$, respectively. There was a significant effect of the variable aciclovir ($P < 0.05$), with an increase of the initial burst release when increasing the incorporated amount of aciclovir. Despite there can be found differences, the initial burst releases were always low.

The aciclovir release profiles of all formulations in pH 7.4 PBS are shown in Figs. 3 and 4.

As can be observed in formulations 1, 2, 3, 4, 7 and 8 aciclovir was released from 50:50 PLGA microspheres slowly within 1–14 days. Afterwards, aciclovir was continuously released for approximately 70 days. This behaviour was concordant with the release kinetic of drugs from PLGA, where, in general, a two-phase release can be observed, firstly a slow release (diffusion phase) followed by a faster release (bulk erosion). But aciclovir release for the first 14 days from formulations 5, 6, and 9 was not as slowly as observed from day 14 onwards, probably due to the optimum amount of gelatin incorporated in the preparation process of these microspheres (80 mg). According to Lemaire et al. (2003) release profiles from porous biodegradable matrices depends not only on the interaction of polymer erosion and drug diffusion, but also on the structure of the porous microenvironment. In our case, incorporation of gelatin, in the appropriate amount, in the outer phase of the emulsion would lead to a change in the physicochemical characteristics of this phase which

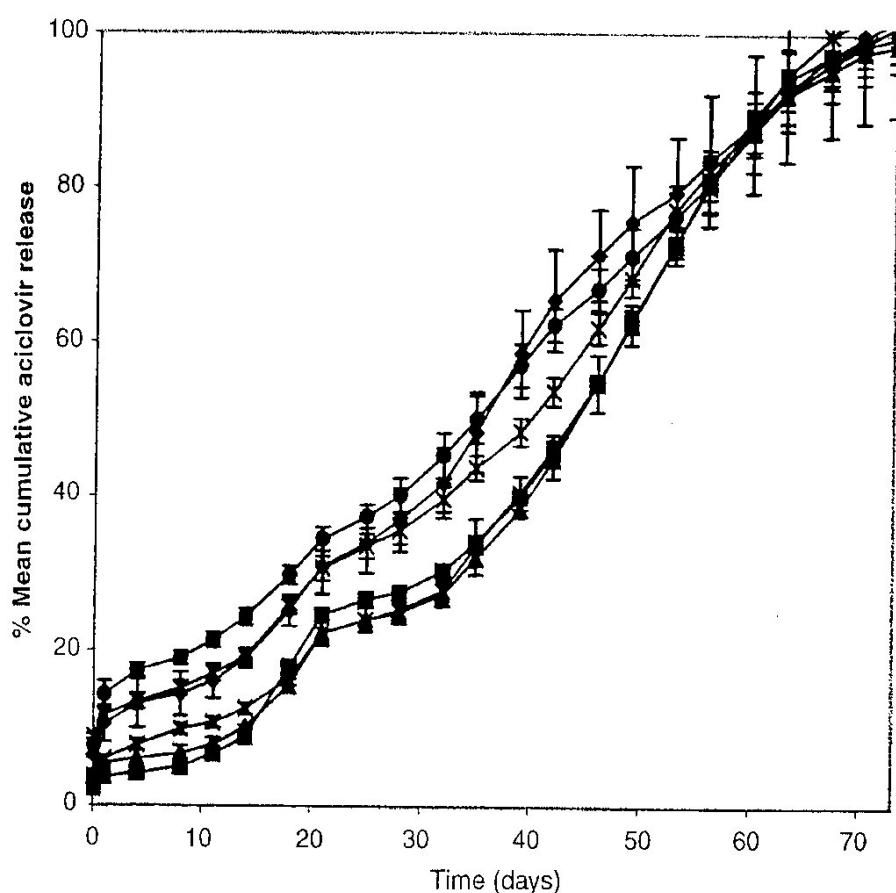


Fig. 3. Mean cumulative release (%) profile of formulations 1 (\blacktriangle), 2 (\times), 3 (\blacksquare), 4 ($+$), 7 (\blacklozenge) and 8 (\bullet), and their replicates from 10 mg microspheres in 3 ml PBS.

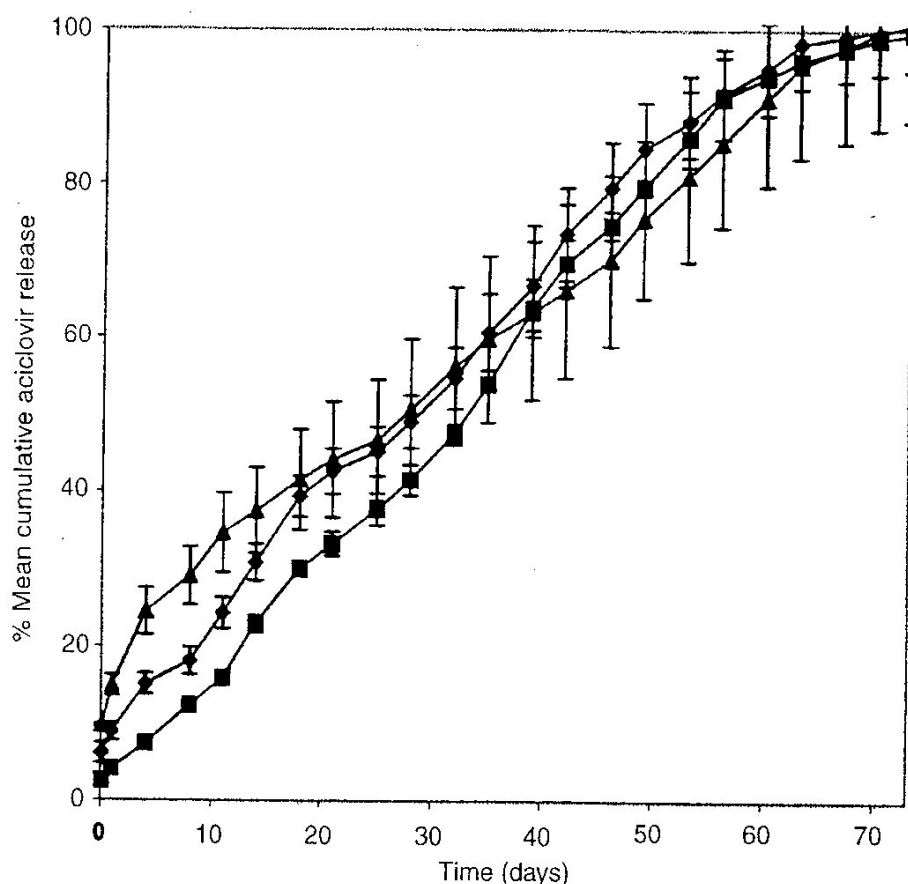


Fig. 4. Mean cumulative release (%) profile of formulations 5 (■), 6 (▲), 9–10 (◆), and their replicates from 10 mg microspheres in 3 ml PBS.

can influence on the evaporation rate of the polymer and the microparticle structure can be affected. In the microspheres preparation process, a porous structure is generated and the drug released depends on the pore size. The drug molecules in the microspheres are either trapped within the polymer, or deposited inside the pores. During the release phase, a drug molecule located inside a pore naturally diffuses towards one of the endpoints of the pore, and eventually reaches the outside. A drug molecule located within the network of micropores first diffuses toward the closest pore. At the same time, the internal surface of the pores erodes slowly by its contact with the solvent, thereby bringing parcels of the polymer and additional material to the outside. When the suitable amount of gelatin is used in the microspheres preparation, the pore generation is improved, the drug diffusion is increased, thus accelerating the release of aciclovir. A SEM photograph illustrating the internal porous structure of the studied microspheres is shown in Fig. 5.

These facts take place particularly during the first 14 days of the present release assay. The cumulative

amount of aciclovir released for 14 days is very important to reach therapeutical levels with the minimum dose of microspheres because if the drug release were too low the drug concentration in the vitreous would not be enough. That was the reason why it has also been studied this response, the amount of aciclovir released during this period of time. The optimum value for this response (Y_4) corresponded to formulation (0,0.06), closes to formulation (0,0). The experimental values showed a significant effect of the gelatin variable ($P < 0.05$). The different release rate of formulations was probably due to gelatin, because when it is incorporated in the appropriate amount in the microspheres preparation, it accelerates the diffusion/dissolution process in the first stages of the release.

Aciclovir and gelatin significantly influenced cumulative amount of aciclovir/mg microspheres released at the end of the assay ($P < 0.05$). The range of responses was $38.06 \pm 1.11 \mu\text{g/mg}$ microspheres in formulation (1,–1) (minimum) to $118.4 \pm 4.25 \mu\text{g/mg}$ microspheres in formulation (0,0) (maximum). This response was adequately fitted to the selected model

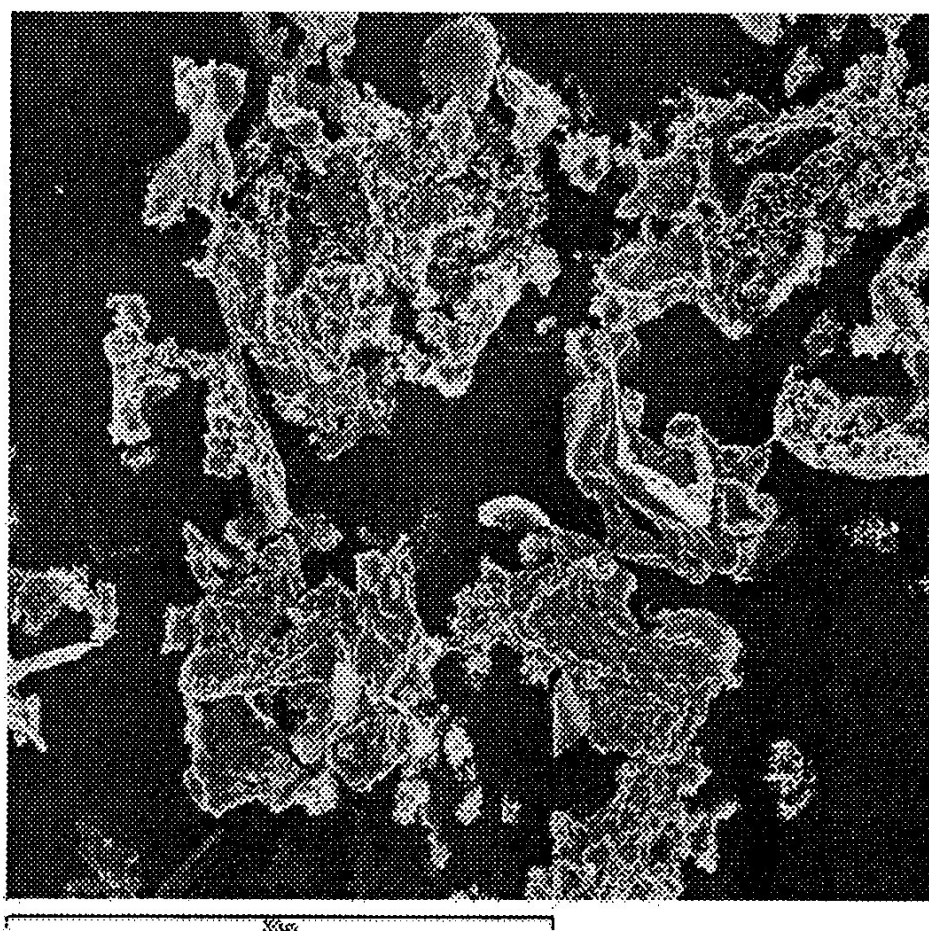


Fig. 5. SEM photograph illustrating the internal porous structure of the microspheres in the 73rd day of the release assay.

according to the equation $Y_5 = 118.4 - 8.36X_1 + 4.63X_2 - 35.48X_1^2 - 23.86X_2^2 - 0.29X_1X_2$. The regression coefficient obtained for Y_5 was 0.95. In order to assess the reliability of the equation that describes the influence of the factors on the microspheres characteristics, in Table 3 there is a comparison between the experimental and predicted values (mean values \pm S.D.)

Table 3
Observed and fitted values (mean values \pm S.D.) for the Y_5 response of the experimental design and two replicates

Formulation	Observed value	Fitted value	Bias (%)
1 (−1,−1)	54.96 \pm 1.42	62.48 \pm 0.37	12.02 \pm 1.98
2 (1,−1)	38.06 \pm 1.11	46.34 \pm 0.37	17.83 \pm 2.86
3 (−1,1)	69.56 \pm 0.87	72.33 \pm 0.36	3.81 \pm 1.41
4 (1,1)	51.50 \pm 0.81	55.03 \pm 0.37	6.41 \pm 1.50
5 (−1.4,0)	64.23 \pm 1.45	59.24 \pm 0.37	8.41 \pm 1.80
6 (1.4,0)	41.66 \pm 2.89	35.60 \pm 0.37	13.85 \pm 5.58
7 (0,−1.4)	73.00 \pm 3.81	64.11 \pm 0.37	13.85 \pm 5.58
8 (0,1.4)	79.40 \pm 2.82	77.23 \pm 0.37	3.73 \pm 2.76
9 (0,0)	117.63 \pm 4.31	118.40 \pm 0.37	3.14 \pm 1.17
10 (0,0)	119.16 \pm 4.98	118.40 \pm 0.37	3.16 \pm 0.93

of the response Y_5 . It can be seen an agreement between the predicted and the experimental values, since low values of bias were found. For this reason it can be concluded that this equation describes adequately the influence of the selected independent variables on the response under study.

According to the applied model, the optimum value for this response (Y_5) corresponded to formulation (−0.1,0.09), which was practically (0,0) of our experimental design, prepared with 80 mg of aciclovir and 80 mg of gelatin, and this was located in the optimum zone of the response surface (Fig. 6).

This formulation did not correspond to that which showed the best encapsulation efficiency (−0.60,0.12), but it released the highest amount of drug at the end of the assay, which was the total amount incorporated in the microspheres. This formulation also presented a high yield of production (70.14 \pm 3.72%) and encapsulation efficiency (70.77 \pm 2.62%) being considered as the optimum one. The release kinetic of this formulation from 1 to 14 days was similar than from 14 days onwards

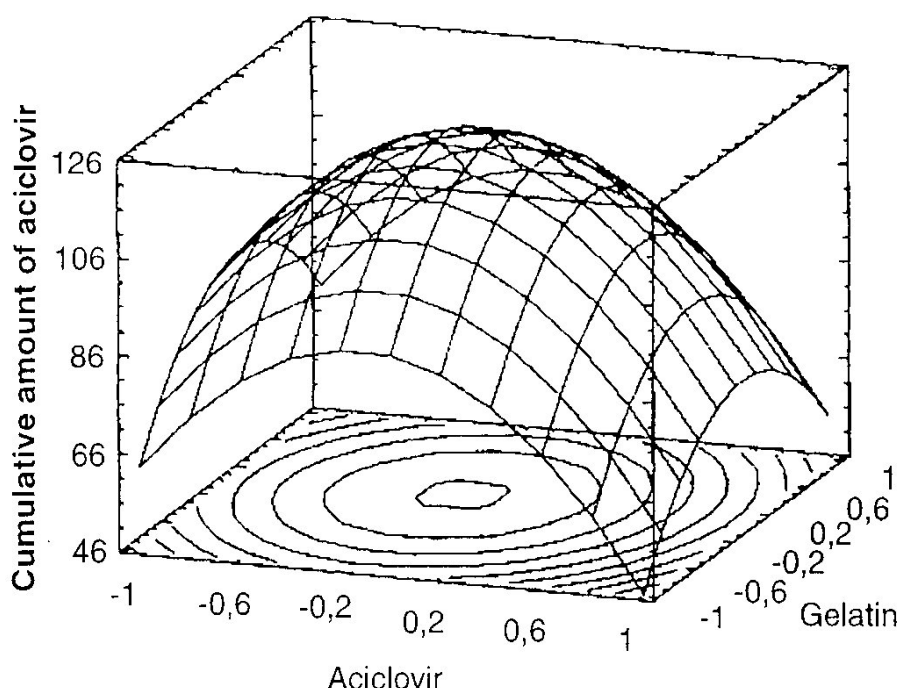


Fig. 6. Surface plot showing the effect of aciclovir and gelatin on the response Y_5 .

and can be adjusted to a linear release curve. This behaviour can be observed when the quantity of drug released by diffusion equals the quantity of drug transferred by erosion. Thus, experimental values were adjusted to a zero-order kinetic from 1 to 63 days ($r > 0.99$) in all cases ($n = 6$), being the mean release constant $1.73 \pm 0.08 \mu\text{g/day per mg microspheres}$. Several authors (Conti et al., 1997) have prepared aciclovir microspheres by the spray drying technique with PLA and PLGA. These authors found that the slower release rate was promoted by PLA (M_w 28,000). These microspheres released a 50% of the encapsulated drug in 8 days (end of the assay). In our case, the selected formulation showed a slow release rate, being the 50% of the incorporated drug released in 30 days. A prolonged release the drug is important for the treatment of ocular pathologies caused by herpes simplex and varicella zoster viruses, which consists of two phases: an induction phase and a maintenance phase that implies long-term treatments for several weeks to prevent reinfections. In our case, administration of a single dose of the selected formulation would be enough to maintain drug levels during a period of time necessary for this kind of treatments. Due to the high loading and its adequate release properties, the selected formulation (2:2:10 aciclovir:gelatin:polymer ratio) could offer a good alternative to successive injections, avoiding

the risk of cataracts, retinal detachment, haemorrhages and endophthalmitis. Taking into account the mean release constant ($1.73 \pm 0.08 \mu\text{g/day per mg microspheres}$), and knowing the vitreous distribution volume in rabbits (1.5 ml), the vitreous elimination half-life of the drug (2.98 h), and the in vitro sensitivity of herpes simplex virus, types 1 and 2, to aciclovir (up to $0.1 \mu\text{g/ml}$) and of varicella zoster virus (up to $1 \mu\text{g/ml}$) (Brigden and Whiteman, 1985), it could be estimated that 0.48 and 4.8 mg of microspheres, respectively, could deliver an adequate amount of the drug in a single injection into the vitreous of an animal model which is in the therapeutic level for 63 days. These doses of microspheres resulted a 40% lesser than those obtained in previous studies of the authors, which demonstrated that the addition of several substances (fatty and non-fatty additives) improved the release rate of aciclovir from PLGA microspheres, with the best results when gelatin was added to the external phase of the emulsion. This formulation corresponded to $(-1.4, 0)$ of the design.

The redispersion characteristics of the selected formulation in saline solution without viscous agent were good and particles showed no aggregation. In accordance with practical experience, these microspheres showed an adequate injectability (12.6 N) over 10 s for a 27G needle, the minimum diameter used for intravitreal administration (Herrero-Vanrell and Refojo,

2001). Furthermore, the administration of this pharmaceutical dosage form through a 27G needle does not require surgical incision or retirement (biodegradable carriers disappear from the site of action once the drug has been released from it).

Microspheres for intraocular administration have been under evaluation for ophthalmic drug delivery purposes for the two past decades, as well as biodegradable polymers for the sustained delivery of drugs. These polymers do not require removal after drug release and are completely eliminated from the body after degradation in non-toxic products. Moreover, poly(α -hydroxy acids) as polylactide, polyglycolide or their copolymers are known to be perfectly biocompatible (Visscher et al., 1985). Although the intraocular administration of particulate systems carries the risk of blurred vision and a foreign body reaction, these adverse effects gradually decrease with time and disappear when the polymer is hydrolysed in its monomers (lactic and glycolic acids). However, when injected in the eye, care must be taken to inject the microspheres in such a way that they do not interfere with the visual pathway. The rate of degradation of microspheres in vivo depends on the presence of drug, the amount of injected microparticles, the nature and molecular weight of the polymer, and the surface area of particles. In our case, the use of an amorphous 50:50 PLGA, the low molecular weight of this polymer and the small size of the microspheres may affect the rate of degradation of microspheres making it faster. Furthermore, the high payloading obtained promotes the generation of pores in the inner matrix enhancing the breakdown of the particles at the first stages of the release assay. These facts make the microspheres reported in this work potentially useful for intravitreal injection.

4. Conclusions

The application of a two-factor five-level central rotatable composite 2^2 +star design resulted a useful tool for the characterisation and optimisation of aciclovir PLGA microspheres prepared by a O/W emulsion solvent technique. The multiple regression analysis of the obtained results led to polynomial equations that describe adequately the influence of the selected variables (aciclovir and gelatin) at different levels on the

responses under study in the present work. According to the studied factors, the selected optimum formulation was that prepared with 80 mg of aciclovir and 80 mg of gelatin corresponding to (0,0) of the experimental design. This formulation released aciclovir at a constant rate for 63 days allowing the treatment of ocular pathologies caused by herpes simplex and varicella zoster viruses by intravitreal administration of a single dose of 0.48 and 4.8 mg of microspheres, respectively, with a 40% reduction of the dose of microspheres to be administered with respect to previous studies.

Acknowledgements

This work was supported by a Complutense Investigation Project (SN) PR 52/00-8899. The authors thank Alfonso Rodríguez for his technical SEM assistance. Centro de Microscopia electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

References

- Beck, L.R., Cowsar, D.R., Lewis, D.H., Cosgrove, R.J., Riddle, C.T., Lowry, S.L., Epperly, T., 1979. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.* 31, 545–548.
- Brigden, D., Whiteman, P., 1985. The clinical pharmacology of aciclovir and its prodrugs. *Scan. J. Infect. Dis. Suppl.* 47, 33–39.
- Cochran, W.G., Cox, G.M., 1957. *Experimental Designs*. Wiley, New York.
- Cohen, S., Yoshioka, T., Lucarelli, M., 1991. Controlled delivery system for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm. Res.* 8, 713–720.
- Conti, B., Bucolo, C., Giannavola, C., Puglisi, G., Giunchedi, P., Conte, U., 1997. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 5, 287–293.
- Gotti, R., Furlanetto, S., Andrisano, V., Cavrini, V., Pinzauti, S., 2000. Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulphate. *J. Chromatogr. A* 875, 411–422.
- Herrero-Vanrell, R., Refojo, M.F., 2001. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 5–16.
- Hughes, P.M., Krishnamoorthy, R., Mitra, A.K., 1996. Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdialysis technique. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 12, 209–224.
- Lemaire, V., Bélair, J., Hildgen, P., 2003. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a

ARTICLE IN PRESS

12 C. Martínez-Sancho et al. / *International Journal of Pharmaceutics xxx (2004) xxx–xxx*

- combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.* 258, 95–107.
- Martínez-Sancho, C., Herrero-Vanrell, R., Negro, S., 2003. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives. *J. Microencapsul.* 20, 799–810.
- McCarron, P.A., Woolfson, A.D., Keating, S.M., 1999. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 193, 37–47.
- Tzafriri, A.R., 2000. Mathematical modelling of diffusion-mediated release from bulk degrading matrices. *J. Control. Release* 63, 69–79.
- Vandervoort, J., Ludwig, A., 2002. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int. J. Pharm.* 238, 77–92.
- Visscher, G.E., Robison, R.L., Maulding, H.V., Fong, J.W., Pearson, J.E., Argentieri, G.J., 1985. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* 19, 349–365.

Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration

C. Martínez-Saicho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro

Enviado para su publicación en Journal of Controlled Release

Artículo 3

Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration

Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration

C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro

Enviado para su publicación en Journal of Controlled Release

Study of gamma irradiation effects on aciclovir poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration.

C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed:

Telephone number: +34913941739, fax number: +34913941736

E-mail address: soneal@farm.ucm.es

Abstract

The γ -irradiation effects on microspheres made of poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) containing aciclovir, with gelatin as additive, were studied. Microspheres containing a 2:2:10 aciclovir:gelatin:polymer ratio were prepared by the solvent evaporation method and sterilised by γ -irradiation at a dose of 25 kGy. Loading efficiency, morphology (particle size analysis, scanning electron microscopy), physicochemical characteristics (infrared absorption spectrophotometry, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and gel permeation chromatography) and *in vitro* dissolution profile during 73 days were performed for the characterisation and evaluation of sterilisation effect on these characteristics. After irradiation of the microspheres, no surface changes were observed by scanning electron microscopy. The mean diameter of microparticles and aciclovir loading efficiency was not affected by the exposure to γ -rays. Infrared spectroscopy, DSC and X-ray diffraction indicated that the transmission patterns of the microspheres components were not modified by irradiation. The controlled release pattern of aciclovir-loaded microspheres for 73 days was not modified by γ -irradiation. GPC measurements showed a decrease in molecular weight. The selected method of sterilisation can be considered excellent because microspheres did not suffer any change due to the irradiation process. The favourable properties of aciclovir microspheres make them suitable systems for the treatment of herpes virus infections, by the intravitreal route, in an animal model.

Introduction

Some ocular pathologies such as herpes simplex virus retinitis and acute retinal necrosis are usually treated by administering aciclovir, being demonstrated that intravitreal administration of aciclovir is more effective than intravenous administration. Nevertheless, due to its short vitreal half-life, it is necessary to administer several doses to maintain therapeutic drug concentrations with the inherent risks of the successive intraocular injections (vitreal haemorrhage, endophthalmitis, retinal detachment and cataract). These inconveniences could be overcome by the use of drug delivery systems able to promote prolonged release of the drug into the vitreal cavity such as biodegradable microspheres.

Poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) is a common, biodegradable medical polymer currently used in injectable drug delivery systems. This polymer is of particular interest for the controlled release of drugs and it can be injected directly in the eye. PLGA has been widely used in drug formulations such as microspheres. In previous studies carried out by the authors, aciclovir-containing PLGA microspheres were prepared by the solvent evaporation method with several additives to identify a potential formulation, which would provide controlled and predictable release kinetics including a minimal burst effect and a long-term release. Best results were obtained with gelatin added to the external phase of the emulsion [1]. After that, this formulation was optimised according to a factorial design, to reduce, as much as possible, the estimated amount of microspheres to be administered. The best formulation according to the applied experimental design was that prepared with a 2:2:10 aciclovir:gelatin:polymer ratio, which released aciclovir at a constant rate for 63 days, resulting potentially useful for the treatment of ocular pathologies caused by herpes simplex and varicella zoster viruses by intravitreal administration of a single dose of 0.48 mg and 4.8 mg of microspheres, respectively [2].

Microspheres intended for intravitreal administration, as other injectable delivery systems, have to meet the pharmacopoeia requirements of sterility. It is

well known that sterilisation techniques, such as sterilisation by steam or dry heat cannot be used for biodegradable aliphatic polyesters, type PLGA and polylactide (PLA) which are the most widely used polymers for the preparation of microspheres intended for parenteral use, since they alter the physical and chemical properties of the polymer. Chemical sterilisation with ethylene oxide causes serious toxicological problems due to residual content of the sterilising agent [3]. Moreover, the stability of a drug incorporated in the polymer matrix can also be altered.

PLGA is a moisture and heat-sensitive polymer. The chemical lability of the polymeric matrix material made of PLGA, as well as some active ingredients limit the strategies for obtaining an acceptable sterile product for aseptic processing and terminal sterilisation using high energy radiation. Terminal sterilisation of injectable drug delivery systems would be preferred from a microbiological point of view, since aseptic processing in a clean room environment under good manufacturing practice conditions is not very costly and labour intensive, but also inherently more risky with respect to microbiological contamination of the finished product. Irradiation treatment, especially γ -irradiation is successfully used for the sterilisation of thermolabile medical devices, such as catheters or syringes and is usually carried out for sterilisation of polymeric biodegradable delivery systems. Furthermore, it is possible to sterilise pharmaceutically active substances with high-energy radiation.

In the pharmaceutical field, one of the applications of ionising radiation is the final sterilisation of biodegradable PLGA microspheres intended for parenteral use [4]. The advantages of sterilisation by irradiation include high penetrating power, low chemical reactivity, low measurable residues, small temperature rise and the fact that there are fewer variables to control. Sterilisation of a product must produce a safety level, sterility assurance level (SAL) of 10^{-6} . A minimum absorbed dose of 25 kGy is regarded as adequate for the purpose of sterilising pharmaceutical products without providing any biological validation [5].

As γ -rays are a form of electromagnetic radiation characterised by high penetration into matter at a very low dose rate (kGy/h), they can modify the performance of irradiated drug delivery systems, prolonging the peroxidative radiolitic mechanism due to the exposure time. The generated polymer degradation products can significantly alter the aqueous microenvironment conditions, e.g., the H^+ concentration within the system. In the release assays, lactic and glycolic acid resulting from the degradation of PLGA polymers can lead to significantly decreased of pH values at the centre of the dosage forms [6]. As the degradation of PLGA is catalysed by protons, this decrease in the micropH can lead to autocatalytic effects and, thus, to accelerate polymer degradation [7,8]. Nevertheless, the imbibition of hydroxide ions from the release medium into the system and/or the diffusion of generated monomeric and/or oligomeric acids out of the system can be rapid enough to prevent acidic microenvironments and, hence, suppress any autocatalytic effect [9,10]. All these facts take place as a function of the size and porosity of the device. Furthermore, polymer degradation products can crystallise within the dosage form [11,12], leading to modified porosities. Depending on their solubility and the respective microenvironmental conditions, these degradation products subsequently dissolve more or less rapidly and diffuse out of the device. Gamma-irradiation of bioresorbable polyesters such as PLGA induces dose-dependent chain scission as well as molecular weight reduction, being the grade of molecular weight reduction a function of the polymer molecular weight and, thus accelerates degradation rate. The degradation rate of polymeric biomaterials due to irradiation treatment is linked to the formation of radicals. In order to prevent radical-induced degradation, antioxidants are often added to pharmaceutical preparations. Pharmacopoeias propose as protecting agents for lipophilic materials, α -tocopherol or ascorbic acid esterified with palmitin- or stearic acid. Another approach to protect the polymer from radical degradation is sterilisation under nitrogen monoxide [13].

As commented above, the effects of γ -irradiation on PLGA and loaded microspheres have been debated by a number of papers, and controversial results

are reported, depending on the active ingredient used [14-18]. This fact makes it necessary to study the effects of gamma-irradiation when applied to a new formulation and overall when the drug is suspended in the delivery system, which can lead to structural changes that can modify the release of the drug, influencing on the dose to be administered. This is especially important in the case of formulations such as microspheres intended for intravitreal administration because local toxicity is related to particular properties of these systems that can be affected by irradiation.

In this work, the effects of γ -irradiation at a dose of 25 kGy on microspheres made of PLGA and loaded with aciclovir were evaluated in order to continue with *in vivo* studies. These microspheres showed an optimum release, reason why they were selected for *in vivo* studies. The influence of radiation on the formulation presented in this study was investigated using a variety of techniques: scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction and gel permeation chromatography (GPC). Aciclovir release profiles of sterilised and non-sterilised microspheres were also compared.

Keywords: Aciclovir, Gelatin, PLGA-microspheres, Intraocular, Sterilisation

Materials and methods

Materials

Aciclovir (acicloguanosine, 9[2-(hydroxyethoxy)methyl]-guanine) was purchased from Reig Farma, S.A. (Spain). Poly (lactic-co-glycolic acid) 50:50, Resomer® RG 502 (PLGA), Mw 15000 Da, inherent viscosity 0.2 dL g⁻¹ was provided by Boehringer Ingelheim Chemicals Division (Germany). Polyvinyl alcohol (PVA, Mw 72000 Da) and gelatin (type A, 100-120 bloom) were supplied by Fluka Chemie AG (Germany) and Merck (Spain), respectively.

Tetrahydrofuran, HPLC grade, was received from Ryedel de Haen (Spain). Methylene chloride (CH₂Cl₂) and sodium hydroxide solution, analytical grade, were obtained from Merck (Spain). Distilled and deionized water (Millipore Corporation, MA, USA) was used in the preparation of buffers and solutions.

Preparation of biodegradable microspheres

Aciclovir-loaded PLGA microspheres were prepared by a solvent evaporation method based on an oil-in-water (o/w) emulsion [1]. The starting amounts of drug and polymer were 80 mg and 400 mg, respectively. The amount of gelatin used in the preparation of microspheres was 80 mg.

Briefly, the organic phase was prepared by dissolving the polymer in 1 mL CH₂Cl₂ using a vortex mixer (IKA Labortechnik, Germany) and then dispersing 80 mg of aciclovir in the polymer solution. The aqueous phase consisted of a PVA solution (0.1%) in which gelatin was dissolved. The solution was prepared by dispersing gelatin in approximately 10 mL of cold 0.1% PVA, allowing the gelatin particles to swell, and afterwards heating the dispersion to 50°C under magnetic stirring. After cooling, this gelatin solution was added to 0.1% PVA to complete volume (100 mL). The organic phase containing a suspension of the drug was slowly added to the aqueous phase to form an emulsion and the system was

continuously stirred for 3 h at room temperature to allow complete evaporation of the organic solvent.

Upon evaporation of the organic solvent, the microspheres were vacuum-filtered through a 5- μm filter, washed 3 times with water and lyophilised (Flexy-Dry™, FTS Systems, USA). The lyophilised microspheres were kept in a dessicator until use.

Gamma irradiation of aciclovir microspheres

Samples were conditioned according to the proceeding described by Hausberger et al. (1995). Seven different batches of the selected formulation were weighted (100 mg) and transferred to 5-ml glass aluminium sealed cap vials. The vials were labelled and packed surrounded with dry ice into a polyurethane container, assuring a low temperature during the irradiation process. Although γ -radiation causes only a minimal temperature rise, the low temperature avoids a possible acceleration of the hydrolytic degradation of the PLGA. The samples were shipped and treated with Co-60 at the Gamma Sterilisation Unit of Aragogamma S.A. (Spain). Following the USP recommendations, an effective sterilising dose of 25 kGy (commonly known as the industrial overkill) was used.

Determination of the aciclovir loading efficiency

Microspheres (10 mg) were dissolved in dichloromethane (1 mL). Aciclovir was extracted from the CH_2Cl_2 solution 3 times into 9 mL of sodium hydroxide solution (10^{-4} M) and centrifuged (Eba 12R, Hettich, Germany) at 6000g for 5 min and the top layers were filtered through a 0.45- μm syringe filter (Tracer, Spain). Aciclovir was assayed spectrophotometrically (DU-6, Beckman, OH, USA) at 254 nm from the extracted aqueous solutions. The total amount of aciclovir was calculated from the aliquots of each extract, in triplicate for each batch of irradiated and non-irradiated microspheres.

Morphological characterisation and size distribution

Microspheres samples were observed by light microscopy. The surface morphology of the microspheres at various stages of the *in vitro* release assay was investigated by scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6400, Japan). The samples were dried and gold sputter-coated before observation by SEM at 20 kV.

Particle size analysis was performed with a Galai Cis-1 computerised inspection system (Galai Production Ltd., Israel). This instrument works on laser diffraction optics. The size range of the Cis-1 version was from 0.5 to 150 μm . Samples of microspheres were suspended in distilled water and analysed while gently stirring. The results are described in terms of volume-density mean diameter.

Injectability

Approximately 10 mg of aciclovir-loaded microspheres were suspended in 1 mL of saline solution. 2 mL syringes fitted with different inner diameter needles and containing suspended microspheres were placed in an apparatus for measuring ejection force (Instron 4501, Instron Corporation, MA, USA).

Infrared absorption spectrophotometry (IR)

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer system 2000 FT-IR infrared spectrophotometer (Perkin-Elmer, UK) against air. Scans for samples were collected at a resolution of 2 cm^{-1} over the wave number region 400-4000 cm^{-1} . Samples were prepared by mixing with spectroscopy grade KBr grain and then pressed into a disc by compaction. IR spectra before and after sterilisation were recorded for aciclovir, PLGA and microspheres. The weight ratio of KBr to powder was about 100.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analysis was performed with a Mettler 820 DSC analyser (Mettler Toledo, Switzerland). Samples of microspheres sterilised and non-sterilised (5-10 mg) were sealed in aluminium pans and heated in an inert atmosphere (40 mL/min of nitrogen). The reference was an empty pan. Scans were recorded under heating only conditions. Samples were scanned from 25° to 300°C at a heating rate 10°C/min. Calibration of the system was performed using indium standards. Data obtained were processed on the system software and glass transition temperatures (T_g) and crystalline melting points (T_m) identified.

X-ray diffraction

X-ray diffraction diagrams were measured by an automatic powder Philips X-PERT MPC diffractometer (CAI, DRX, UCM) combined with a high temperature chamber (Anton Paar HTK 10) with a Pt heating filament, Ni-filtered Cu- $K\alpha$ radiation ($\lambda=1.54056 \text{ \AA}$), a 2θ interval configuration, angle range 3-60°, scan step size 0.04° and time per step 1s. Under these conditions, samples of aciclovir, polymer, non-loaded microspheres and aciclovir-loaded microspheres γ -irradiated and non-irradiated were assayed.

In vitro release studies

Sterilised and non-sterilised, aciclovir-loaded microspheres (10 mg) were placed in a volume of 3 mL of isotonic phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (sink conditions) in a water shaker bath (NE-5, Clifton, UK) at 37°C with a constant agitation (100 strokes per minute). At fixed time intervals, the PBS was removed with a syringe, filtered through a 0.45- μm filter and aciclovir concentration was measured spectrophotometrically at 251 nm (no component interfered with aciclovir). The same volume of fresh medium was replaced to continue the release

study. The test was performed in duplicate from each batch of microspheres (7 batches).

After the release assay, microspheres were dried for two days in a vacuum dessicator and residual aciclovir was extracted and analysed.

Gel permeation chromatography (GPC)

Microparticles were dissolved in tetrahydrofuran (5 mg/ml). After filtration (PTFE filter, pore size 0.45 μm , Tracer, Spain), 10 μl of the solution were injected in a Styragel HR 4E column (7.8 x 300 mm, Waters, MA, USA). All measurements were performed at a flow rate of 1 ml/min at room temperature with a Waters 1525 binary HPLC pump. The refractive indexes were measured using a 2414 refractive index detector (Waters, MA, USA). The principle of separation occurs by different retention of the molecules in the pores of the column according to their hydrodynamic volume. Molecular weights were calculated by the system calibration software using narrow polystyrene reference materials of known molecular weights: 114000, 43700, 18600, 9650, 6520 and 2950 Da (Waters Corporation, Polymer Standard Service GmbH, Germany). Evaluation was done using a cubic universal calibration curve (Waters, MA, USA). The molecular weights are indicated as weight-average molecular weights (M_w) and number-average molecular weights (M_n). Samples of irradiated and non-irradiated microspheres at the beginning and at different stages of the *in vitro* release assay were analysed.

Results and discussion

The influence of irradiation exposure on the characteristics of the formulation presented in this study was investigated using a variety of techniques including

SEM, IR, DSC, X-ray diffraction and GPC. Aciclovir loading efficiency and release profiles of sterilised and non-sterilised microspheres were also studied.

The effective aciclovir loading was determined to know if aciclovir was affected by the irradiation dose applied. Aciclovir, which is a slightly water-soluble drug (1.3 mg/ml at 25°C), was incorporated in the microspheres by the solvent-emulsion-evaporation method. The drug was added to the inner phase of the emulsion forming a suspension and the external phase included gelatin. The mean loading efficiency was not affected by the sterilisation process ($p < 0.05$), resulting in $70.86 \pm 2.15\%$ and $70.98 \pm 2.36\%$, for irradiated and non-irradiated microspheres, respectively. Aciclovir remained stable in the microspheres after irradiation exposure, data that were confirmed in our laboratory by HPLC according to the method described by Boulieu et al. [19].

Gamma-irradiation is associated with an increase in temperature [15], which can lead to a fusion of the microparticles during the irradiation treatment. In our case, the mean diameters of sterilised and non-sterilised microspheres were not significantly different being 45.47 ± 13.36 and 46.38 ± 12.79 μm , respectively, demonstrating that no particle fusion occurred after gamma-irradiation treatment. These results were expected because samples were surrounded by dry ice during the irradiation exposure, avoiding a rise in temperature.

An injectability study was conducted to determine the needle inner diameter limit for successful intravitreal injection. Injectability of microspheres is an important criterion to define the target of microspheres to be administered through a minimum needle inner diameter. Studies were performed to measure the force needed to eject the suspension of microspheres in saline solution with no redispersability modifier agent, from the syringe, as a function of the needle inner diameter. Suspensions of sterilised microspheres were injected through different needle diameters (27G, 25G and 21G). Data (12.5 N, 8.4 N and 5.5 N, respectively) indicated that no partial or complete blockage of microspheres suspension flow was observed (the application of an ejection force of maximum 12 Newton over 10 seconds can be considered as a suitable development criteria to

define the target for a minimum needle inner diameter). The results suggest that no injection difficulties were developed so these microspheres showed an adequate injectability in PBS owing to their small particle diameter, thus making them suitable for injection through a needle with the minimum inner diameter. Furthermore, these studies demonstrated that in our case, it would not be necessary the use of substances such as hydroxypropylmethylcellulose or hyaluronic acid employed by other authors to improve injectability of particles [20].

The infrared absorption spectra obtained for aciclovir, PLGA, non-loaded microspheres, as well as the IR spectrum for aciclovir-loaded microspheres did not suffer any change due to the sterilisation process. Figure 1 shows the IR spectrum of sterilised aciclovir-loaded microspheres. FTIR spectrum of PLGA produced characteristic wave numbers in the region from 1300 to 1500 cm^{-1} . PLGA showed a C-H bending vibration of methyl group at 1397 and 1456 cm^{-1} and an additional C-H vibration of methylene group at 1426 cm^{-1} . We found that the IR spectra of the sterilised and non-sterilised microspheres exhibited a transmission pattern with the same characteristic wave numbers of PLGA, as well as the characteristic wave numbers of aciclovir [21].

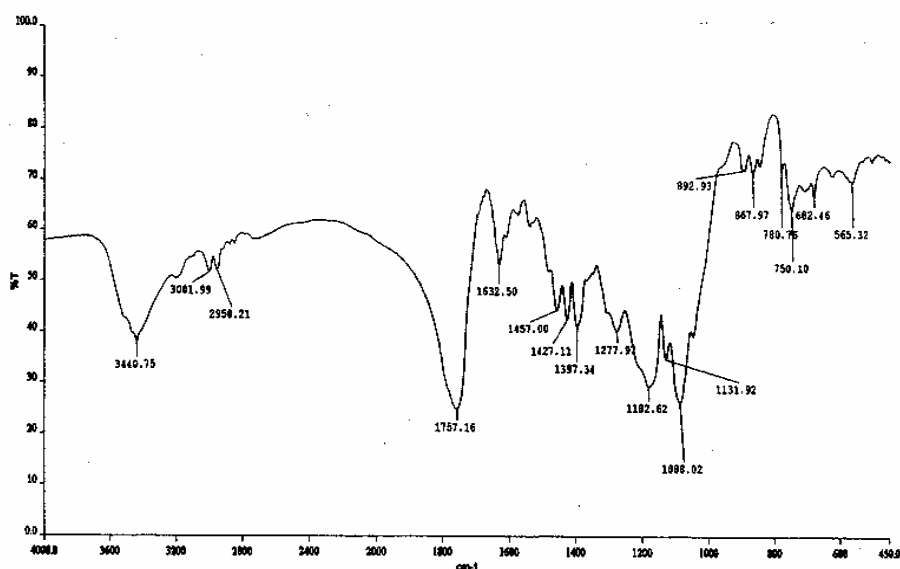


Figure 1. IR spectrum of gamma-irradiated aciclovir-loaded microspheres (non-irradiated microspheres overlapped with this spectrum).

Samples of polymer, non-loaded microspheres and aciclovir-loaded microspheres were analysed by DSC before and after sterilisation. The non-loaded microspheres exhibited the same glass transition temperature as the PLGA raw material ($T_g = 44.83^\circ\text{C}$), revealing that the production process did not affect the copolymer structure. Nevertheless, gamma-irradiation caused a reduction in the T_g values of polymer (41.12°C) and non-loaded microspheres (37.17°C). It is well known that these relatively low glass transition temperatures could favour subsequent reactions of free radicals due to the high mobility of the polymeric chains. When comparing the DSC thermograms of sterilised and non-sterilised aciclovir-loaded microspheres (Figure 2) it is clearly observed a concordance between the thermograms. In both cases, it was observed a broad endotherm in the range $75\text{--}100^\circ\text{C}$ corresponding to a loss of residual water. The aciclovir melting endotherm remained located practically at the same temperature for non-sterilised and sterilised microspheres ($T_m = 243.67^\circ\text{C}$ and 240.67°C , respectively), and the T_g value (44.67°C for non-sterilised) resulted very slightly increased for sterilised

aciclovir microspheres (46.52°C). This shift of PLGA T_g to a higher temperature, in sterilised and non-sterilised aciclovir microspheres, can be attributed to a lower mobility of the polymer chains probably due to the incorporation of aciclovir. A small endothermic peak around 175°C (173°C for non-sterilised and 177°C for sterilised microparticles) was also observed, which might be due to the fusion of a morpous form of aciclovir. The sterilised microspheres showed an exothermic peak at 204.17°C, which can be related to the heating process during the calorimetric assay of the sample.

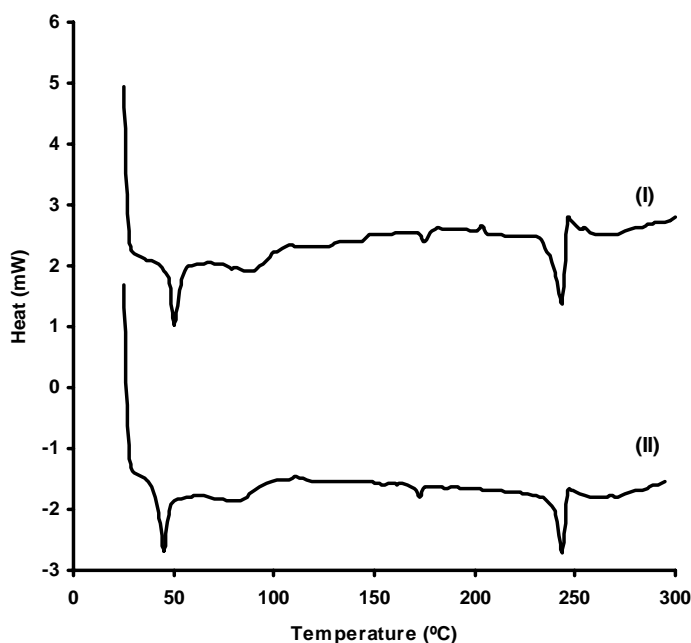


Figure 2. DSC thermograms of sterilised (I) and non-sterilised (II) aciclovir-loaded microspheres.

The strongest maximums of intensity in the X-ray diffraction pattern for aciclovir were obtained at 6.94° , 10.46° , 23.82° , 26.06° and 29.18° . On the contrary, the polymer pattern showed no maximums according to its amorphous state. It was observed that the microencapsulation process used in this work did not modify the polymer characteristics as can be observed in the diffractograms of non-loaded microspheres. The aciclovir-loaded microspheres (irradiated and non-irradiated) showed the maximums of crystalline aciclovir (6.98° , 10.5° , 23.94° , 26.14° and 29.26°) superposed to the corresponding pattern of the polymer, confirming the results observed in DSC analysis and indicating that no specific interactions between aciclovir and PLGA occurred (Figure 3).

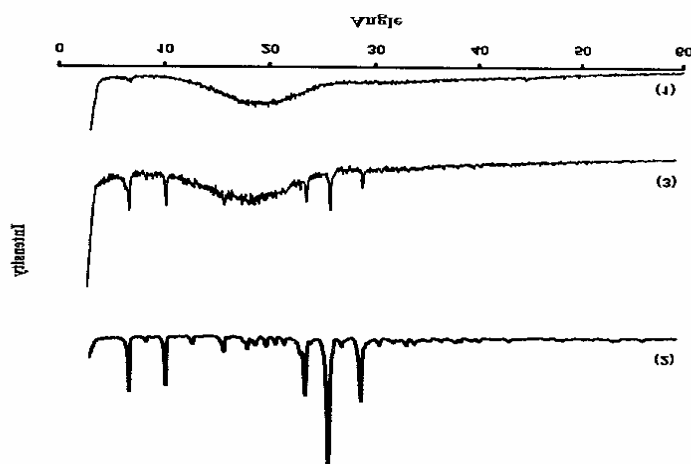


Figure 3. X-ray scattered intensity as a function of the diffraction angle 2θ . Intensity scaling is arbitrarily applied to the curves. Curves obtained for aciclovir (1), polymer (2) and sterilised microspheres (3).

These facts conclude that aciclovir is incorporated in the microspheres in the crystalline status and there was no chemical interaction among their components, which can produce structural changes, and the evaporation solvent process does not modify the crystalline halos of the drug.

Release rate assays were carried out with sterilised and non-sterilised microparticles. Figure 4 shows the SEM photographs of sterilised aciclovir-loaded PLGA microspheres at different stages ($t=0, 8, 28, 50$ and 73 days). At time $t=0$ (before drug release) the shape of the microparticles was spherical and possessed a smooth surface with the absence of macropores (size >100 nm) and no drug crystals were detected on their surface. On day 8, of the release assay, although the sterilised microspheres appeared agglomerated, the surface morphology remained almost unchanged. On day 28 it can be observed a loss of structure which is in progress until day 50 and on day 73 only remained rests of microspheres walls (“ghost-like” structures). Surfaces of non-sterilised microparticles were similar (data not shown).

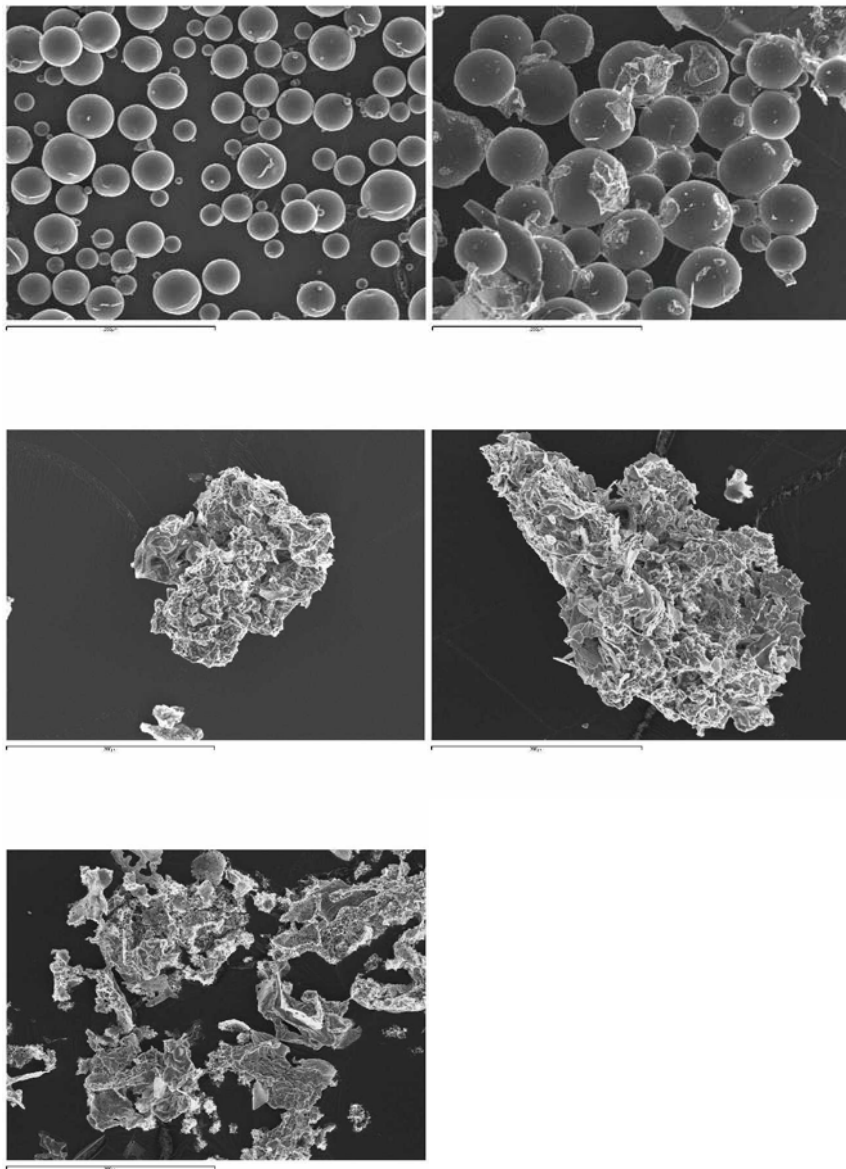


Figure 4. SEM photographs of aciclovir-loaded microspheres surfaces upon exposure to phosphate buffer pH 7.4 at 37°C, $t = 0, 8, 28, 50$ and 73 days (scale 200 μm). Only sterilised microparticles are shown, the morphologies of non-sterilised microparticles are very similar.

PLGA microspheres have demonstrated to be sensitive to γ -irradiation, in some cases, causing an increase of the *in vitro* drug release rate. The percentage of cumulative aciclovir released *in vitro* from 7 batches of non-sterilised and gamma-sterilised microparticles were examined in PBS buffer for a period of up to 2 months (figure 5). A similarity factor (f_2) [22,23] was calculated to compare dissolution profiles of aciclovir from the microspheres before and after sterilisation. Conceptually, f_2 is a measure of the similarity in the percent dissolution between two profiles (it is estimated that a value for the similarity factor ranging between 50 and 100 indicates similarity between curves) and allows the characterisation of the release profile of the drug. Table 1 lists the f_2 values, being in the range 92.78-99.81, thus both curves can be considered similar. These results are in agreement with those previously obtained for ganciclovir [24].

Batch No	f_2 sterilised microspheres
1	97.60
2	94.73
3	96.61
4	99.45
5	99.53
6	99.81
7	92.78

Table 1. f_2 values for sterilised batches of microspheres.

The release profiles from sterilised and non-sterilised PLGA microspheres were biphasic and exhibited a low initial burst followed by a zero-order drug release phase. Drug release was completed after 73 days in both cases. The aciclovir released from the microspheres was adjusted to a zero-order kinetic from 1-63 days with a mean release constant of 1.735 ± 0.089 $\mu\text{g/day/mg}$ (non-sterilised microspheres) ($r=0.997$) and 1.733 ± 0.093 $\mu\text{g/day/mg}$ (sterilised microspheres)

($r=0.998$). The release constant values were compared by the Kurskal-Wallis equation [25]. There were found no significative differences between the release constant values obtained before and after sterilisation ($p<0.05$). The release constant value is a very important factor to calculate the dose of aciclovir-loaded microspheres to be administered by the intraocular route in those pathologies caused by herpes simplex and varicella-zoster viruses, in which aciclovir has demonstrated to be effective. The amount of microspheres must be reduced as much as possible when they are intended for intraocular administration because local toxicity depends on it, and properties of microspheres must be maintained after sterilisation.

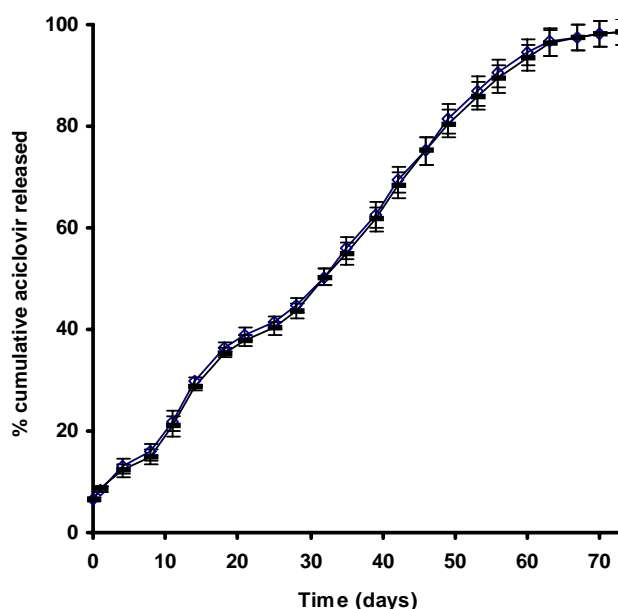


Figure 5. % Cumulative releases (\pm S.D.) from 10 mg of microspheres in 3ml PBS before (\diamond) and after (\blacksquare) exposition to an effective dose (25 kGy) of γ -irradiation.

Irradiation has no statistically significant effect on the percentage of aciclovir released at the end of the assay ($p<0.05$). In conclusion, gamma-sterilisation at the applied dose (25 kGy) did not affect the release rate of the drug.

Figure 6 shows the mean molecular weight for the studied microspheres (sterilised and non-sterilised). Weight-average molecular weight (M_w) and number-average molecular weight (M_n) were determined. Before sterilisation, the M_w for polymer and non-loaded microspheres was practically the same, demonstrating that the solvent evaporation process used for the preparation of microspheres has no influence on the polymer molecular weight, as observed in DSC studies. Aciclovir-loaded microspheres showed the typical peaks for polymer and aciclovir. A GPC study was carried out to determine whether exposure to γ -rays influence on PLGA microspheres behaviour during the release assay. According to the obtained results, the degradation process can be divided into three phases. The first phase (0-20th day) corresponds to polymer decomposition, being evident by a decreasing in M_w and M_n . It can be observed that M_w decreased faster than M_n . According to some authors [15], this fact supports the random chain scission as the mechanism for hydrolytic copolymer degradation, remaining the smaller chains on the average larger than oligomers and monomers. In the following phase, the molecular weight remained quite stable. A possible explanation for this stabilisation of the molecular weight decrease is that M_w is measured on the solid fraction of the polymer and the low molecular weight molecules of the polymer should dissolve in the test liquid and be removed from the solid fraction so that they are no more taken into account for the calculation of M_w (approximately on 60th day). During the third phase, which corresponds to the last 8 days of our assay, an increase of M_w can be observed because a higher amount of soluble monomers and oligomers is being released.

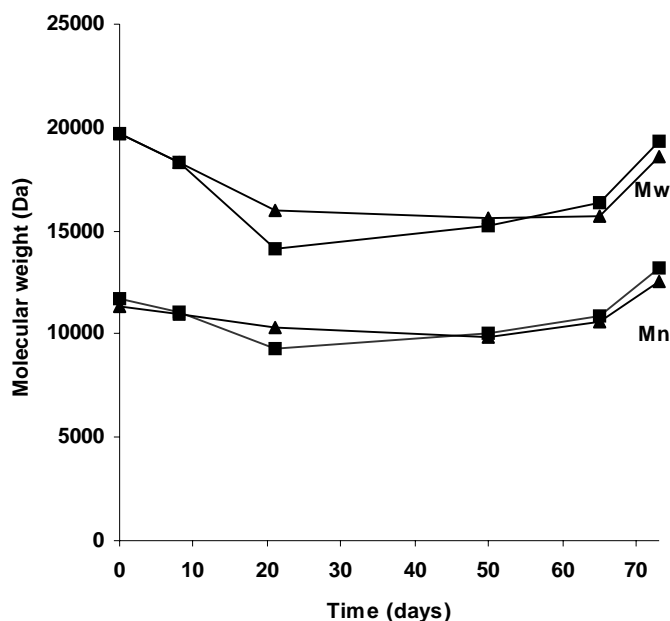


Figure 6. Decrease of the molecular weights (M_w and M_n) in sterilised microparticles (■) and non-sterilised microparticles (▲), analysed by GPC, during the 73 days testing in PBS at 37°C.

Ionising irradiation, as gamma irradiation, produce ionising phenomena, which can lead to a higher molecular reactivity. This process can be favoured by the temperature arise of samples generated by radiation. In fact, γ -irradiation at room temperature on microspheres made of PLGA of low and high molecular weights [26,27,28] caused a lowering of M_w and M_n , with a greater decrease of molecular weight polymer in irradiated when compared to non-irradiated microspheres [14]. In the present study, this effect was not observed because there was only a slightly decrease of M_w . It is known that the hydrolytic degradation process is accelerated by heat. As previously reported, protection of samples with dry ice before and during sterilisation prevented temperature arise, but there is no evidence that this fact avoided the initial molecular weight decrease, at least in non-loaded microspheres (PLGA $M_w \sim 30000$ Da). This fact allows us to consider

that the drug incorporated into the microparticles plays an important role on the microspheres behaviour after irradiation. In this work, aciclovir is incorporated in the microspheres as a suspension improving PLGA stability. Furthermore, aciclovir at the solid state is known to be stable to temperature. By other hand, the polymer used in microspheres preparation has a low molecular weight, being probably less susceptible to suffering changes than those of high molecular weight.

Conclusion

The sterilisation procedure reported in this work maintained the initial conditions of the aciclovir microspheres. Furthermore, this method allows final sterilisation of the formulation avoiding the risks of contamination during the microencapsulation process. The observed effect could be attributed to three factors: the low molecular weight of the PLGA polymer, the protection of the samples during the irradiation exposure and the incorporation of the drug as a suspension. The results obtained in this work, let us conclude that the selected method of sterilisation can be considered excellent because microspheres did not suffer any change due to the irradiation process. The favourable properties of the aciclovir microspheres make them suitable systems for the treatment of herpes virus infections, by the intravitreal route, in an animal model.

Acknowledgement

This work was supported by a Complutense Investigation Project (SN) PR 52/00-8899 and a MCyT Project (MAT 2000-1764-CO2-01). The authors thank A. Rodríguez for his technical SEM assistance. Centro de Microscopía electrónica Luis Bru (CAI, UCM). C. Deza and M.R. Ramos for their technical IR assistance (AEM) and X-ray diffraction CAI (UCM).

References

- [1] C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir. Influence of fatty and non-fatty additives, *J. Microencapsul.* 20(6) (2003) 799-810.
- [2] C. Martínez-Sancho, R. Herrero-Vanrell, S. Negro, Optimisation of aciclovir poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration of aciclovir using a factorial design study, *Int. J. Pharm.* (2004), in press.
- [3] K.A. Athanasiou, G.G. Niederauer, C.M. Agrawal, Sterilisation, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers, *Biomaterials* 17(2) (1996) 93-102.
- [4] M.B. Sintzel, A. Merkli, C. Tabatabay, R. Gurny, Influence of irradiation sterilization on polymers used as a drug carriers- a review, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997) 857-879.
- [5] European Guideline 3AQ4a, The use of ionising radiation in the manufacture of medicinal products, Official Publications in the European Communities, London, 1992.
- [6] A. Shenderova, T.G. Burcke, S.P. Schwendeman, The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins, *Pharm. Res.* 16(2) (1999) 241-248.
- [7] G. Spenlehauer, M. Vert, J.P. Benoit, A. Boddaert, In vitro and in vivo degradation of poly(D,L-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method, *Biomaterials* 10(8) (1989) 557-563.
- [8] M. Dunne, O.I. Corrigan, Z. Ramtoola, Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials* 21(16) (2000) 1659-1668.
- [9] J.M. Anderson, M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug. Del. Rev.* 28(1) (1997) 5-24.

- [10] P. Sansdrap, A.P. Möes, In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Release* 43(1) (1997) 47-58.
- [11] A. Goepferich, R. Langer, Modeling monomer release from erodible polymers, *J. Control. Release* 33(1) (1995) 55-69.
- [12] T.G. Park, Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition, *Biomaterials* 16 (1995) 1123-1130.
- [13] M.B. Sintzel, K. Schwach-Abdellaoui, K. Mader, R. Stosser, J. Heller, C. Tabatabay, R. Gurny, Influence of irradiation sterilization on semi-solid poly(ortho ester), *Int. J. Pharm.* 175 (1998) 165-176.
- [14] B. Bittner, K. Mäder, C. Kroll, H.H. Bocher, T. Kissel, Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray drying technique: influence of γ -radiation on radical formation and polymer degradation, *J. Control. Release* 59(1) (1999) 23-32.
- [15] A.G. Hausberger, R.A. Kenley, P.P. Deluca, Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles, *Pharm. Res.* 12(6) (1995) 851-856.
- [16] L. Montanari, M. Constantini, E.C. Signoretti, L. Valvo, M. Santucci, M. Barolomei, P. Fattibene, S. Onori, A. Faucitano, B. Conti, I. Genta, Gamma irradiation effects on poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Release* 56(2) (1998) 219-229.
- [17] L. Montanari, F. Cilurzo, L. Valvo, A. Faucitano, A. Buttafava, A. Groppo, I. Genta, B. Conti, Gamma irradiation effects on the stability of polylactide-co-glycolide microspheres containing clonazepam, *J. Control. Release* 75(3) (2001) 317-330.
- [18] C. Volland, M. Wolff, T. Kissel, The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Release* 31 (1994) 293-305.

- [19] R. Boulieu, C. Gallant, Silberstein, N. Determination of acyclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatog. B Biomed. Sci. Appl.* 693(1) (1997) 233-236.
- [20] A.A.S. Veloso, Q. Zhu, R. Herrero-Vanrell, M.F. Refojo, Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38(3) (1997) 665-675.
- [21] British Pharmacopoeia, Vol. 1, HMSO, London, 1993, pp. S5.
- [22] V.P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, J-P. Liu, In vitro dissolution profile comparison- statistics and analysis of the similarity factor, f_2 , *Pharm. Res.* 15(6) (1998) 889-896.
- [23] Y. Tsong, T. Hammerstrom, P. Sathe, V.P. Shah, Statistical assessment of mean differences between two dissolution data sets, *Drug Inf. J.* 30 (1996) 1105-1112.
- [24] R. Herrero-Vanrell, L. Ramirez, A. Fernández-Carballido, M.F. Refojo, Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process, *Pharm. Res.* 17(10) (2000) 1323-1328.
- [25] D.C. Montgomery, Design and analysis of experiments, John Wiley and Sons, Inc., Belmont, 1991.
- [26] M. Shameem, H. Lee, K. Burton, B.C. Thanoo, P.P. Deluca, Effect of gamma-irradiation on peptide-containing hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 53(6) (1999) 309-313.
- [27] N. Faisant, J. Siepmann, P. Oury, V. Laffineur, E. Bruna, J. Haffner, J.P. Benoit, The effect of gamma-irradiation on drug release from bioerodible microparticles: a quantitative treatment, *Int. J. Pharm.* 242(1-2) (2002) 281-284.
- [28] H.T. Lee, J. Wang, C-H. Wang, Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies, *J. Control. Release* 83(3) (2002) 437-452.

El objetivo central de esta Tesis ha sido el desarrollo de una formulación de micropartículas biodegradables con aciclovir, de liberación controlada, destinadas a su administración intraocular y que resulte útil para el tratamiento de las infecciones herpéticas intraoculares en una sola dosis. Para ello, tal como se indicó en la sección correspondiente, se desarrollaron microesferas de aciclovir utilizando como polímero biodegradable el copolímero láctico-glicólico (PLGA).

En un primer momento se procedió a la modificación y adaptación de un método sencillo de elaboración que permitiera la obtención de microesferas con un rendimiento óptimo y que, además, dieran lugar a la liberación controlada de la sustancia activa desde el primer momento. Para este fin se adicionaron distintos aditivos a la fase interna y externa de la emulsión, seleccionándose aquel que se aproximó más al objetivo propuesto. Posteriormente, se intentó optimizar la formulación, seleccionando aquella que presentaba mejores resultados frente a los factores y parámetros considerados como fundamentales para la forma farmacéutica en cuestión. Por último, se llevó a cabo la esterilización final de la formulación optimizada por radiación gamma, comprobando que el proceso, en las condiciones empleadas en este trabajo, no afecta a las características y el comportamiento de las microesferas desarrolladas.

Discusión General

Evaluación de la influencia de la incorporación de aditivos en las características de microesferas de aciclovir preparadas con copolímero láctico-glicólico

Teniendo en cuenta que el aciclovir es ligeramente soluble en agua, nuestra primera preocupación se centró en adaptar un método de preparación de microesferas, lo más sencillo posible, que diera como resultado el máximo rendimiento tanto del proceso como de la eficiencia de encapsulación del fármaco.

El objetivo central de esta Tesis ha sido el desarrollo de una formulación de micropartículas biodegradables con aciclovir, de liberación controlada, destinadas a su administración intraocular y que resulte útil para el tratamiento de las infecciones herpéticas intraoculares en una sola dosis. Para ello, tal como se indicó en la sección correspondiente, se desarrollaron microesferas de aciclovir utilizando como polímero biodegradable el copolímero láctico-glicólico (PLAGA).

En un primer momento se procedió a la modificación y adaptación de un método sencillo de elaboración que permitiera la obtención de microesferas con un rendimiento óptimo y que, además, dieran lugar a la cesión controlada de la sustancia activa desde el primer momento. Para este fin se adicionaron distintos aditivos a la fase interna y externa de la emulsión, seleccionándose aquel que se aproximó más al objetivo propuesto. Posteriormente, se intentó optimizar la formulación, seleccionando aquella que presentaba mejores resultados frente a los factores y parámetros considerados como fundamentales para la forma farmacéutica en cuestión. Por último, se llevó a cabo la esterilización final de la formulación optimizada por radiación gamma, comprobando que el proceso, en las condiciones empleadas en este trabajo, no afecta a las características y el comportamiento de las microesferas desarrolladas.

Evaluación de la influencia de la incorporación de aditivos en las características de microesferas de aciclovir preparadas con copolímero láctico-glicólico

Teniendo en cuenta que el aciclovir es ligeramente soluble en agua, nuestra primera preocupación se centró en adaptar un método de preparación de microesferas, lo más sencillo posible, que diera como resultado el máximo rendimiento tanto del proceso como de la eficiencia de encapsulación del fármaco.

El método empleado fue el de evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A. Las microesferas obtenidas, a pesar de presentar un elevado rendimiento de encapsulación presentaron un problema en cuanto al ensayo de cesión del fármaco *in vitro* (pH 7,4 y 37°C), ya que la velocidad de liberación durante los primeros 14 días del mismo era muy baja ($0,439 \pm 0,038$ µg/día/mg microsferas), aunque sí se obtenía una cesión prolongada durante al menos 49 días. Por ello, y con el fin de aumentar la velocidad de cesión durante los primeros catorce días se incorporaron, durante la preparación de las microesferas, distintas sustancias, todas ellas ampliamente utilizadas para formas de administración parenteral. Se seleccionaron 7 sustancias: 4 de naturaleza hidrofílica (PEG 300, PEG 1500, HPMC y gelatina) y 3 de naturaleza lipofílica (miristato de isopropilo, vitamina E y Labrafil® M 1944 CS). Las sustancias lipofílicas fueron incorporadas en la fase interna de la emulsión, mientras que las hidrofílicas se incorporaron a la fase externa, ya que en estudios preliminares quedó demostrado que cuando los aditivos hidrofílicos se incorporaban en la fase orgánica, la eficiencia de encapsulación era muy baja. Este hecho se atribuyó a que los aditivos hidrofílicos promovían la liberación de aciclovir de las microesferas inmaduras, por lo que se decidió incorporarlos en la fase externa de la emulsión, mientras que los aditivos lipofílicos se incorporaron en la fase interna de la misma.

El primer parámetro evaluado fue el rendimiento del proceso de obtención de microesferas. De los resultados obtenidos se comprobó que dichos rendimientos fueron superiores para las microesferas preparadas con excipientes hidrofílicos, obteniéndose los valores más altos para las microesferas preparadas con HPMC y gelatina, correspondiendo el valor máximo a las microesferas preparadas con éste último (**Art. 1, Tabla 1, pág. 55**). Por el contrario, el rendimiento del proceso para las microesferas con aditivos lipofílicos no resultó significativamente diferente al obtenido para las microesferas sin aditivos. Por su parte, la eficacia de encapsulación también disminuyó cuando se incorporaron excipientes lipofílicos en la fase interna de la emulsión, observándose el efecto contrario cuando se

incorporaron excipientes hidrofílicos en la fase externa de la emulsión. El valor más alto para este parámetro se obtuvo con la gelatina, ($76,10 \pm 3,37\%$) (**Art. 1, Tabla 1, pág. 55**). El efecto observado al adicionar la gelatina podría ser debido a las cargas positivas del aditivo que crearían un medio ácido en la fase externa, el cual impediría la pérdida masiva del aciclovir en el proceso de maduración de las microesferas. La obtención de una eficacia de encapsulación alta se considera de gran interés porque permite disminuir la dosis de microesferas a administrar por vía intravítrea. Este hecho además adquiere una gran relevancia cuando se trata de administrar fármacos en el segmento posterior, ya que el tiempo de biodegradación del polímero presumiblemente es menor que en otras zonas del organismo con mayor actividad enzimática, pudiendo aumentar la toxicidad. El diámetro de las micropartículas se modificó de forma significativa por la adición de excipientes, si bien no se observaron diferencias originadas por las características de solubilidad del aditivo. Todas las formulaciones preparadas presentaron un tamaño de partícula apropiado para su administración intraocular, destacando la formulación conteniendo gelatina, con el tamaño más pequeño (**Art. 1, Tabla 1, pág. 55**). Los tamaños de partícula más grandes fueron los obtenidos utilizando HPMC y Labrafil®. Este efecto se atribuyó a una modificación de la velocidad de difusión del solvente volátil, por distintas causas, que dio lugar a unas microesferas de mayor tamaño.

En una etapa posterior nos decidimos a investigar una propiedad importante en la práctica a la hora de administrar las microesferas: la inyectabilidad a través de una aguja de diámetro apropiado (27G). La baja dispersabilidad que presentaron las microesferas preparadas con excipientes lipofílicos en solución salina condujo a unos valores altos para este parámetro (se considera como valor óptimo hasta un límite máximo de 12 Newton durante 10 segundos), mientras que las preparadas con aditivos hidrofílicos y particularmente con gelatina, mostraron un valor de inyectabilidad de 8,06 N. Este hecho constató que las microesferas de

aciclovir obtenidas mediante la adición de gelatina a la fase externa de la emulsión serían fácilmente administrables utilizando una aguja de 27G de diámetro.

Continuando con el estudio, el siguiente objetivo que abordamos fue la determinación de las características de las microesferas obtenidas. En primer lugar, la morfología, estudiada mediante microscopía electrónica de barrido reveló que todas las microesferas preparadas con aditivos hidrofílicos poseían una forma esférica con una superficie regular y ausencia de poros, mientras que las que contenían aditivos lipofílicos aparecían aglomeradas, debido a posibles restos del aditivo que pueden permanecer en su superficie (**Art. 1, Figura 1, pág. 57**). En segundo lugar, la espectroscopía de absorción en el infrarrojo demostró que el método elegido para la preparación de las microesferas no modificó las características del polímero, y que los aditivos utilizados en las proporciones descritas no interaccionaron con el mismo. En un siguiente paso, se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido y se pudo confirmar, al igual que por espectroscopía de absorción en el infrarrojo, que el polímero no sufre ningún cambio debido al proceso de elaboración de las microesferas, ya que las temperaturas de transición vítrea coincidieron tanto para el polímero como para las microesferas no cargadas con sustancia activa. A pesar de que es conocido que el cloruro de metileno utilizado para disolver el polímero tiene una alta afinidad por el mismo y lo plastifica, en nuestro caso, las trazas residuales fueron insignificantes como para afectar la temperatura de transición vítrea del PLAGA. Por su parte, el termograma para las microesferas de aciclovir mostró las mismas características observadas para el polímero y el aciclovir por separado, así como para las mezclas realizadas de los componentes, observándose que los aditivos no influían sobre el comportamiento térmico de las microesferas (**Art. 1, Figura 2, pág. 58**).

Por último, nuestro siguiente objetivo en esta primera etapa del trabajo consistió en evaluar el prometedor potencial de las microesferas de aciclovir como sistemas de liberación *in vitro* del fármaco. Para ello, nos planteamos la realización

de un estudio de cesión en solución isotónica tamponada pH 7,4, por ser éste el pH del vítreo, a una temperatura de 37°C. Los perfiles de liberación del fármaco, en todos los casos, se compararon con los obtenidos con una formulación de microesferas sin aditivos. La cesión durante las primeras 24 horas (“burst”), en todos los casos, fue menor del 5%. Como ya se ha comentado anteriormente, las cantidades de aciclovir cedidas por las microesferas elaboradas sin aditivo durante los primeros días del ensayo de cesión fueron muy bajas ($0,439 \pm 0,038$ µg/mg de microesferas). Los perfiles de liberación durante los 8 primeros días de la cesión demostraron que los excipientes lipofílicos no mejoraban la misma. No obstante, las formulaciones con vitamina E y Labrafil® potenciaron la cesión de aciclovir desde el día 14 al 32. (**Art. 1, Figura 3, pág. 59**). Los aditivos hidrofílicos modificaron la cesión en todas las microesferas analizadas. El PEG 300 y PEG 1500 presentaron perfiles de cesión semejantes, encontrándose por encima de los correspondientes a los de HPMC, que no modificó la cesión del aciclovir a través de la matriz polimérica durante los primeros 28 días del ensayo de cesión. Los mejores resultados, al igual que en otras propiedades evaluadas, se obtuvieron con la gelatina como excipiente. Estas microesferas mostraron una cesión más rápida desde el primer día del ensayo (**Art. 1, Figura 4, pág. 60**), lo que nos permitió seleccionar la formulación preparada con gelatina para continuar los estudios, por ser ésta la que presentó mejores características para lograr los objetivos planteados en esta memoria. La liberación de aciclovir a partir de las microesferas se ajustó de forma satisfactoria a una cinética de orden cero. De acuerdo con la constante de velocidad de cesión obtenida, se estimó la cantidad de microesferas a administrar en una dosis única capaz de liberar aciclovir en cantidades teóricamente terapéuticas durante al menos 49 días que resultó ser de 0,74 mg y 7,4 mg para el tratamiento de patologías oculares producidas por los virus del herpes simple y herpes zoster, respectivamente.

En definitiva, los resultados de este estudio nos llevaron a concluir el interés de las microesferas de PLAGA preparadas con gelatina como sistemas de liberación de aciclovir para uso intraocular.

Con el objeto de minimizar la cantidad de microesferas a administrar se planteó un diseño experimental cuyos resultados se discuten a continuación.

Aplicación de un diseño experimental para la optimización de una formulación de microesferas de copolímero láctico-glicólico conteniendo aciclovir como sustancia activa y gelatina como aditivo

La aplicación de diseños experimentales en sistemas farmacéuticos tales como microesferas, ha demostrado ser una herramienta útil para analizar las interacciones entre los factores que influyen en la preparación y las características de las mismas. En función de las dos variables elegidas (aciclovir y gelatina) y de las respuestas que se querían evaluar (**Art. 2, Tabla 1, pág. 68**) se optó por un diseño central rotacional 2^2 estrella con dos replicados.

Como ya se ha mencionado en el anterior estudio, las microesferas se obtuvieron por el método de evaporación del solvente, a partir de una emulsión de fase externa acuosa, en la que se solubiliza el excipiente, la gelatina.

Un paso inicial para la evaluación de las formulaciones obtenidas, a partir del diseño, fue su análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido, revelando que todas ellas presentaban una forma y superficie similares (**Art. 2, Figura 1, pág. 70**). Otra propiedad especialmente importante de las microesferas destinadas para uso intraocular, objeto del presente estudio, es el tamaño de partícula, encontrándose que ninguna de las variables estudiadas tuvieron una influencia significativa sobre este parámetro y que el tamaño obtenido

en todos los casos se considera adecuado para administración a través de una aguja de diámetro 27G. Asimismo, se realizó un análisis por calorimetría diferencial de barrido para poder observar posibles diferencias con las microesferas elaboradas en el anterior estudio. El comportamiento calorimétrico puso de manifiesto que las características fisicoquímicas de las microesferas se mantenían invariables, produciéndose toda la serie de sucesos térmicos descritos en el estudio previo (**Art. 2, Figura 2, pág. 71**).

Una vez comprobadas las propiedades generales de las microesferas, el siguiente paso consistió en evaluar los parámetros seleccionados para la optimización. La optimización nos llevó a alcanzar valores elevados para el rendimiento del proceso, encontrándose una influencia significativa ($p < 0,05$) de la cantidad de aciclovir utilizada en la preparación de las microesferas. Los valores más bajos para este parámetro correspondieron a las formulaciones con una alta cantidad de aciclovir con respecto a la proporción aciclovir:polímero, lo que resulta lógico debido a la alta proporción de soluto en estas formulaciones que promueve la precipitación del polímero (**Art. 2, Tabla 2, pág. 70**). Con respecto a la eficiencia de encapsulación se encontró que las dos variables tuvieron influencia sobre este parámetro. Los valores más bajos correspondieron a las formulaciones con altas proporciones aciclovir:polímero (**Art. 2, Tabla 2, pág. 70**). Este hecho, probablemente es debido a que se forma una suspensión (el aciclovir no es soluble en la fase interna de la emulsión formada), disminuye la estabilidad de dicha suspensión durante el proceso de preparación de las microesferas al aumentar la cantidad de fármaco incorporado, conduciendo a su vez a una disminución del porcentaje de aciclovir incorporado en el sistema. La formulación óptima para esta respuesta resultó ser la (-0,60;0,12).

Una vez comprobados los rendimientos, el siguiente aspecto a evaluar fue el comportamiento de las microesferas de PLAGA como sistemas de liberación controlada de aciclovir, mediante estudios de cesión *in vitro*. En el estudio,

analizamos como respuestas las cantidades de fármaco cedido en distintos estadios del ensayo con el fin de determinar si las formulaciones serían capaces de ceder a una velocidad suficiente como para lograr concentraciones adecuadas de la molécula activa durante periodos de tiempo prolongados, que permitieran su posible utilización en una dosis única administrada por vía intraocular. La primera respuesta estudiada fue el porcentaje de aciclovir cedida durante el primer día del ensayo, siendo este valor inferior al 10% para todas las formulaciones y existiendo un efecto significativo ($p < 0,05$) de la variable aciclovir (**Art. 2, Tabla 2, pág. 70**). Al comparar de forma global los perfiles de cesión de la molécula activa en todas las formulaciones, se pudo comprobar que se verificaba la cinética de cesión general de los fármacos incluidos en los sistemas microparticulares preparados con PLAGA (**Art. 2, Figuras 3 y 4, pág. 72 y 73**). La cesión en las formulaciones 1, 2, 3, 4, 7 y 8 desde el día 1 al 14 fue lenta, para posteriormente liberar aciclovir de una forma continua 70 días (**Art. 2, Figura 3, pág. 72**), periodo de tiempo superior al estudiado con anterioridad. Por el contrario, la cesión de fármaco en las formulaciones 5, 6 y 9 fue más rápida que en las anteriores todas ellas preparadas con la misma cantidad de gelatina incorporada en la fase externa (80 mg). La justificación de esta velocidad de cesión más rápida puede basarse en que la cantidad de gelatina añadida en la fase externa de la emulsión fuese la óptima para el proceso de elaboración provocando una serie de cambios en las propiedades físicoquímicas de esta fase, que a su vez influirían sobre la velocidad de evaporación del solvente y así se vería afectada la estructura de las micropartículas (**Art. 2, Figura 4, pág. 73**), viéndose favorecida la formación de poros internos²⁰² (**Art. 2, Figura 5, pág. 74**) y por tanto la difusión del fármaco, y como consecuencia de los resultados se observó una velocidad de cesión más rápida del mismo durante los primeros 14 días del ensayo de cesión *in vitro*.

La determinación de la cantidad de aciclovir liberada durante estos primeros 14 días es un factor crítico para conseguir niveles terapéuticos con la

²⁰² Lemaire, V., Bélair, J., Hildgen, P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.*, 258: 95-107 (2003).

misma cantidad de microesferas, ya que si la liberación es muy baja podrían no alcanzarse dichos niveles. Para esta respuesta, la única variable que mostró un efecto significativo ($p < 0,05$) fue la gelatina. El valor óptimo para esta respuesta corresponde a la formulación (0;0,06) próxima al (0;0) (preparada con 80 mg aciclovir y 80 mg gelatina). Las diferencias encontradas en la velocidad de liberación para las distintas formulaciones puede deberse a que cuando se incorporaba este aditivo en la cantidad adecuada se aceleran los procesos de difusión/disolución en las primeras fases del ensayo.

Al estudiar la cantidad total de aciclovir liberado al final del ensayo de cesión, se observó una influencia significativa tanto de la variable aciclovir como de la variable gelatina. Esta respuesta se ajustó al modelo seleccionado mediante una ecuación binomial ($Y_5 = 118,4 - 8,36X_1 + 4,63X_2 - 35,48X_1^2 - 23,86X_2^2 - 0,29X_1X_2$) cuya confianza se confirmó al encontrarse una concordancia entre los valores experimentales y los predecibles (**Art. 2, Tabla 3, pág. 74**). El coeficiente de regresión obtenido fue de 0,95. El valor óptimo para la respuesta cantidad cedida al final del ensayo correspondió a la formulación (-0,1;0,09) próxima a la formulación (0;0), preparada con 80 mg de aciclovir y 80 mg de gelatina, del diseño localizada en la zona óptima de la superficie de respuesta (**Art. 2, Figura 6, pág. 75**).

La formulación (0;0) no es la que presentó una mayor eficacia de encapsulación, que corresponde a la (-0,60;0,12), pero es la que presentó una mayor cantidad de aciclovir/mg microesferas. Además, para la misma se obtuvo un alto rendimiento del proceso (70%). Esta formulación cedió aciclovir de acuerdo a una cinética de orden cero con $K_0 = 1,73 \pm 0,08 \mu\text{g/día/mg}$ de microsferas durante 63 días ($r > 0,99$).

Mediante este proceso de optimización se estimó que una cantidad de 0,48 mg y 4,8 mg de microesferas preparadas en proporción 2:2:10

(aciclovir:gelatina:polímero), cantidad 40% inferior a la obtenida en estudios anteriores, sería adecuada para su administración por vía intravítrea en dosis única para el tratamiento de patologías oculares producidas por los virus del herpes simple y herpes zoster, respectivamente.

Como toda preparación para administración intraocular, esta formulación ha de cumplir unos requerimientos de esterilidad, por ello en la siguiente etapa de nuestro trabajo se abordó el estudio de la influencia del proceso de esterilización sobre la formulación seleccionada de micropartículas PLAGA con aciclovir como sustancia activa y gelatina como aditivo antes y después de ser sometidas a radiación gamma en unas condiciones especiales en las que se evita el aumento de temperatura asociada al proceso.

Evaluación de la influencia de la esterilización con radiación gamma sobre las características de una formulación optimizada de microesferas de aciclovir preparadas con copolímero láctico-glicólico y gelatina.

La primera cuestión que nos planteamos para la esterilización de la formulación seleccionada de microesferas fue la elección del método más adecuado para cumplir los requisitos necesarios de esterilidad de todo producto para administración por vía parenteral. Teniendo en cuenta las propiedades particulares que poseen sus componentes y vistos los problemas que surgen al utilizar métodos de esterilización generales, se optó por la aplicación de radiación gamma a una dosis de 25 kGy. Además, teniendo en cuenta que las radiaciones ionizantes como es la radiación gamma, inducen fenómenos de ionización que dan lugar a una mayor reactividad de las moléculas, y ya que dichos procesos pueden ser incrementados por la temperatura que generan las propias radiaciones en las muestras, éstas fueron enviadas para su esterilización protegidas con hielo seco a fin de evitar un aumento de la temperatura que podría provocar no sólo alteraciones

sobre la sustancia activa sino también sobre el polímero integrante del sistema de liberación controlada que se ha diseñado. Para determinar la influencia de esta radiación sobre las características de las microesferas se seleccionaron una serie de parámetros y técnicas asociadas que nos pudieran aportar datos suficientes sobre posibles modificaciones que se pudieran producir en las propiedades de las microesferas seleccionadas. Algunas de ellas ya las habíamos empleado con anterioridad.

Como primer parámetro a evaluar se eligió el rendimiento de encapsulación de aciclovir. Se encontró que la radiación no tenía efecto significativo ($p < 0,05$) sobre este parámetro y no sufría degradación a causa de la esterilización. Ya que en ciertos casos se ha descrito una fusión entre las micropartículas, se estudiaron los tamaños de partícula después del proceso de esterilización, no hallándose diferencias significativas entre los tamaños antes y después del mismo, por lo que quedó demostrado que no se produjo fusión de las partículas tras la exposición a la radiación debido a la protección de las muestras con hielo seco durante el proceso de esterilización evitando un aumento de la temperatura.

Para determinar el tamaño de aguja a utilizar para la administración de las microesferas en suspensión se realizó un estudio de inyectabilidad con distintos diámetros internos de aguja y sin emplear agentes modificadores de la redispersabilidad, como ya se ha descrito a lo largo de esta memoria. Los valores obtenidos indicaron que no se producía bloqueo del flujo de la suspensión de microesferas a través de las agujas empleadas en el estudio, demostrándose que las micropartículas esterilizadas poseen un diámetro adecuado para su administración a través de una aguja de 27G cuando se dispersaron en solución salina.

Mediante la espectroscopía de absorción en el infrarrojo se pudo comprobar que los espectros obtenidos para el aciclovir, el polímero, las

microesferas sin cargar y las microesferas con sustancia activa, no sufrían cambios a consecuencia de la radiación gamma, ya que presentaban patrones de transmisión con los picos a las longitudes de onda características de cada componente (**Art. 3, Figura 1, pág. 95**).

Por su parte, los resultados obtenidos del análisis de muestras mediante análisis calorimétrico diferencial de barrido revelaron que el proceso de elaboración de microesferas no afectó a la estructura del copolímero, ya que el valor de la temperatura de transición vítrea para el polímero y las microesferas que no contienen aciclovir sin esterilizar fue el mismo para ambos (44,83°C). Cuando se compararon los termogramas obtenidos para el polímero y las microesferas sin aciclovir esterilizadas se vio que la radiación gamma provocó una disminución en el valor de T_g . Este hecho probablemente sea debido a que las temperaturas de transición vítreas relativamente bajas pueden favorecer reacciones de radicales libres a causa de la alta movilidad de las cadenas poliméricas. Entre los termogramas obtenidos para las microesferas esterilizadas y no esterilizadas existió una clara concordancia, aunque la radiación gamma produjo un ligero aumento en los valores de temperatura de transición vítrea (**Art. 3, Figura 2, pág. 96**), lo que puede ser atribuido a un cierto impedimento en la movilidad de las cadenas poliméricas tras la incorporación del aciclovir en forma de suspensión. Como se ha observado en los otros artículos de este trabajo, aparece un pequeño pico endotérmico a 175°C aproximadamente, que podría corresponder a la fusión de una forma morfa del aciclovir. Las microesferas esterilizadas presentaron un pico exotérmico a 204,17°C probablemente relacionado con el proceso de calentamiento durante el ensayo calorimétrico de la muestra.

Otra técnica que nos aportó información sobre el comportamiento de las microesferas frente a la esterilización fue la difracción de rayos X. Con esta técnica se confirmaron los picos máximos característicos del aciclovir, la ausencia de picos en el polímero, como corresponde a su estado amorfo y la conservación de estas

propiedades del polímero durante el proceso de microencapsulación. Las microesferas seleccionadas (esterilizadas y no esterilizadas) mostraron un patrón con la superposición de todos estos sucesos, lo que permite asegurar que el aciclovir fue incorporado en su forma cristalina en las microesferas, no experimentando ningún cambio debido al método de preparación de las mismas y que no existieron interacciones específicas entre sus componentes (**Art. 3, Figura 3, pág. 97**), confirmando por otra parte los resultados obtenidos en el análisis calorimétrico diferencial de barrido.

Las microesferas, tanto esterilizadas como sin esterilizar, se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido no apreciándose diferencias en la superficie de las mismas. Además, con el fin de analizar los posibles cambios morfológicos de las mismas a lo largo del ensayo de cesión en función de la erosión del polímero, se observaron las micropartículas a diferentes tiempos del ensayo antes y después de su exposición a la radiación gamma. Como se pudo observar en la fotografía correspondiente al primer día del ensayo de cesión, se confirmó la ausencia de fusión y además se puso de manifiesto que las características superficiales descritas en anteriores estudios se mantenían, así como los cambios morfológicos esperados tal como pérdida progresiva de estructura, a medida que avanzaba en el tiempo del ensayo de cesión *in vitro* (**Art. 3, Figura 4, pág. 99**).

Una vez evaluada la influencia de la esterilización sobre las características fisicoquímicas de las microesferas se procedió a realizar un ensayo de cesión *in vitro* para valorar su capacidad para liberar el fármaco una vez esterilizadas comparando a la vez con las mismas microesferas no irradiadas. Para hacer la comparación entre los dos perfiles de cesión hasta el tiempo final del ensayo (73 días) se calculó el factor de similitud encontrándose valores comprendidos entre 92,78 y 99,81 que permitieron considerar ambas curvas como similares (**Art. 3, Tabla 1, pág. 100**). La cesión de aciclovir de las microesferas se ajustó a una

cinética de orden cero desde el día 1 hasta el día 63, no obteniéndose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de constantes obtenidas para las microesferas no esterilizadas ($1,735 \pm 0,089$ $\mu\text{g}/\text{día}/\text{mg}$ microesferas) y esterilizadas ($1,733 \pm 0,093$ $\mu\text{g}/\text{día}/\text{mg}$ microesferas). La determinación de estas constantes es importante, ya que condiciona la cantidad de microesferas a administrar. Tampoco se obtuvieron diferencias en el porcentaje de aciclovir liberado al final de ensayo, pudiendo concluir que la radiación, en la dosis aplicada (25 kGy) y en las condiciones ensayadas, no modificó la velocidad de liberación del fármaco (**Art. 3, Figura 5, pág. 101**).

Por último y para determinar la influencia de la radiación gamma sobre el comportamiento de las micropartículas durante el ensayo de cesión, se realizó un estudio mediante la técnica de cromatografía de permeación de geles o cromatografía de exclusión por tamaños. A pesar de que existen numerosas técnicas para la determinación del peso molecular de polímeros (punto de fusión, espectrometría de masas por electronebulización, nefelometría y turbidimetría), la técnica seleccionada fue la SEC, comúnmente denominada como cromatografía de permeación de geles (GPC), que consiste en la separación de macromoléculas de acuerdo con su tamaño. Como confirmación de los resultados obtenidos con el análisis calorimétrico diferencial de barrido y en la difracción de rayos X, el método de evaporación del solvente utilizado para la preparación de las microesferas no influyó en el peso molecular del polímero. Las microesferas de aciclovir mostraron los picos típicos del polímero y aciclovir. El estudio de GPC se realizó para determinar la influencia de la radiación sobre el comportamiento de las microesferas a lo largo del ensayo de cesión. Por los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* se comprobó que el proceso de degradación se podía dividir en tres fases (**Art. 3, Figura 6, pág. 103**). La primera fase (0-20 días), correspondiente a la descomposición, en la que era evidente una disminución tanto de M_w como M_n , aunque el M_w disminuía más rápidamente que el M_n , lo que parece confirmar la escisión de cadenas al azar como mecanismo que explicaría la degradación

hidrolítica del polímero. En la siguiente fase, el peso molecular permaneció casi estable, probablemente debido a que el M_w se mide sobre la fracción sólida del polímero y las moléculas de bajo peso molecular del polímero se disolverían en el líquido de ensayo y se retirarían de la fracción sólida, por lo que ya no se tendrían en cuenta para el cálculo del mismo (**Art. 3, Figura 6, pág. 103**) (aproximadamente hasta el día 60 del ensayo). Durante la tercera fase, que corresponde a los 8 últimos días del ensayo, se pudo observar un aumento de M_w debido a que se han liberado una mayor cantidad de monómeros y oligómeros solubles.

Las radiaciones ionizantes, como son las radiaciones gamma, inducen fenómenos de ionización que dan lugar a una mayor reactividad de las moléculas, proceso que se ve favorecido por el aumento de temperatura que generan las propias radiaciones en las muestras. Así, diversos estudios han demostrado que la radiación gamma a temperatura ambiente provoca sobre las microesferas preparadas con PLAGA, tanto de alto como de bajo peso molecular, un descenso del M_w y M_n , presentando un mayor descenso del peso molecular las microesferas irradiadas que las no irradiadas. En nuestro caso, no se observó este efecto, ya que sólo disminuyó ligeramente el M_w . Este hecho se puede atribuir, por una parte a la protección de las muestras con hielo seco, y por otra parte a la utilización de un polímero de bajo peso molecular que es menos susceptible de sufrir alteraciones que los de alto peso molecular.

En consecuencia y teniendo en cuenta los excelentes resultados obtenidos, se ha podido concluir que el método de esterilización elegido ha resultado adecuado para la formulación objeto de estudio, ya que las propiedades de las microesferas no sufrieron alteraciones significativas debido al proceso de irradiación. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten considerar la formulación seleccionada, microesferas esterilizadas de aciclovir preparadas con una proporción 2:2:10 aciclovir:gelatina:polímero, adecuada para ser ensayada en

un modelo animal mediante la inyección intraocular de las partículas suspendidas en solución salina isotónica.

CONCLUSIONES

Los resultados recogidos en los artículos de investigación derivados de esta Tesis nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. El método de evaporación del solvente, a partir de una emulsión de fase externa acuosa, resulta adecuado para la microencapsulación de aciclovir, obteniéndose altos rendimientos del proceso y de la eficacia de encapsulación del fármaco.
2. La adición de aditivos hidrofílicos en la fase externa de la emulsión mejora las características con respecto a las microesferas preparadas sin aditivos, obteniéndose los mejores resultados para las micropartículas preparadas con gelatina en proporción 1:2:10 (aciclovir:gelatina:polímero).
3. La optimización de la formulación permitió seleccionar como óptima la preparada con una proporción 2:2:10 (aciclovir:gelatina:polímero).
4. La administración de 0,48 mg y 4,8 mg de microesferas de la formulación seleccionada sería suficiente para el tratamiento de infecciones producidas por el virus del herpes simple y herpes zoster, respectivamente. Este resultado supone una reducción del 40% de la cantidad a administrar con respecto a la formulación sin optimizar.
5. La inyectabilidad de la formulación seleccionada resulta apropiada para su administración en suspensión, sin necesidad de incorporar agentes suspensores.

6. La esterilización de las microesferas mediante su exposición a una dosis de radiación gamma de 25 kGy, en las condiciones descritas en este trabajo, no supone una modificación significativa en sus características iniciales.
7. La formulación seleccionada, microesferas esterilizadas de aciclovir preparadas con una proporción 2:2:10 aciclovir:gelatina:polímero, resulta adecuada para ser ensayada en un modelo animal mediante la inyección intraocular de las partículas suspendidas en solución salina isotónica.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander, L.J. Diseases of the retina. *Clinical Ocular Pharmacology*, 3ª edición. Barlett, J.D. y Jaanus, S.D. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 809-839 (1995).

Álvarez, C., Herrero-Vanrell, R., Negro, S., Molina, I.T., Hernández, M.T., Pastoriza, P. y Barcia, E. Dexamethasone microspheres for intravitreal administration. *3rd Spanish Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery*, 83 (1998).

Antcliff, R.J., Spalton, D.J., Stanford, M.R., Graham, E.M., Fytche, T.J. y Marshall, J. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema. An optical coherence tomography study. *Ophthalmology*, 108: 765-772 (2001).

Araiz, J.J., Refojo, M.F., Arroyo, M.H., Leong, D.F.L., Albert, D.M. y Tolentino, F.I. Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34: 522-530 (1993).

Atherton, S.S. Acute retinal necrosis: insights into pathogenesis from the mouse model. *Herpes*, 8: 69-73 (2001).

Atkins, T.W. y Peacock, S.J. The incorporation and release of bovine serum albumin from poly-hydroxybutyrate-hydroxivalerate microcapsules. *J. Microencapsul.*, 13: 709-717 (1996).

Barbault-Foucher, S., Gref, R., Russo, P. y Bochot, A. Design of poly-ε-caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. *J. Control. Release*, 83: 365-375 (2002).

Barlett, J.D. Ophthalmic Drug Delivery. *Clinical Ocular Pharmacology*, 3ª edición. Barlett, J.D. y Jaanus, S.D. (ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 47-74 (1995).

Bauer, D.J., Collins, P., Tucker, W.E. y Macklin, A.W. Treatment of experimental herpes simplex keratitis with acycloguanosine. *Br. J. Ophthalmol.*, 63: 429-435 (1979).

Benita, S., Benoit, J.P., Puisieux, F. y Thies, C. Characterization of drug loaded poly(*d,l*-lactide) microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 73: 1721-1724 (1984).

Berger, A.S., Cheng, C.K., Pearson, P.A., Ashton, P., Crooks, P.A., Cynkowski, T., Cykowska, G. y Jaffe, G.J. Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluoruracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37: 2318-2325 (1996).

Bernatchez, S.F., Camber, O., Tabatabay, C. y Gurny, R. Use of hyaluronic acid in ocular therapy. *Biopharmaceutics of ocular drug delivery*. CRC Press Inc., Boca Raton, 105-121 (1993).

Bernatchez, S.F., Tabatabay, C. y Gurny, R. Sodium hyaluronate at 0.25% used as vehicle increases the bioavailability of topically administered gentamicin. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 231: 157-171 (1993).

Bodmeier, R. y Chen, H. Preparation of biodegradable poly(\pm)lactide microparticles using a spray-drying technique. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 754-757 (1988).

Bodmeier, R. y McGinity, J.W. Poly (lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. I. Methods and morphology. *J. Microencapsul.*, 4: 279-288 (1987a).

Bourges, J.L., Gautier, S.E., Delie, F., Bejjarú, R.A., Jeanny, J.C., Gurny, R., BenEzra, D. y Behar-Cohen, F.F. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 3562-3569 (2003).

Buri, P. y Gurtler, F. Les formes ophtalmiques à action prolongée. *Les preparations ophtalmiques*. Buri, P. (ed.), Lavoisier, Paris, 127-215 (1995).

Cavalier, M., Benoit, P. y Thies, C. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly(\pm)lactide microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.*, 38: 249-253 (1986).

Cha, Y. y Pitt, C.G. A one-week subdermal delivery system for methadone based on biodegradable microcapsules. *J. Control. Release*, 7: 69-78 (1988).

Chan, L.W., Heng, P.W. y Wan, L.S.C. Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification. *J. Microencapsul.*, 14: 545-555 (1997).

Chen, G.Q., Lin, W., Coombes, G.A., Davis, S.S. y Illum, L. Preparation of human serum albumin microspheres by a novel acetone-heat denaturation method. *J. Microencapsul.*, 11: 395-407 (1994).

Cheng, C.K., Berger, A.S., Pearson, P.A., Ashton, P. y Jaffe, G.F. Intravitreal sustained-release dexamethasone device in the treatment of experimental uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 442-453 (1995).

Chithambara-Thano, B., Sunny, M.C. y Jayakrishnan, A. Cross-linked chitosan microspheres: Preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44: 283-286 (1992).

Chrai, S.S. y Robinson, J.R. Ocular evaluation of methylcellulose vehicle in albino rabbit. *J. Pharm. Sci.*, 63: 1218-1223 (1974).

Chu, C.C. Degradation phenomena of two linear aliphatic polyester fibres used in medicine and surgery. *Polimerization*, 26: 591-594 (1985).

Colin, J., Tournoux, A., Chastel, C. y Renard, G. Superficial herpes simplex keratitis. Double blind comparative trial of acyclovir and idoxuridine. *Nouv. Presse Med.*, 10: 2969-2975 (1981).

Collins, P. The spectrum of antiviral activities of acyclovir *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 12 (suppl. B): 19-27 (1983).

Collum, L.M.T., Benedict-Smith, A. y Hillary, I.B. Randomised double-blind trial of acyclovir and idoxuridine in dendritic corneal ulceration. *Br. J. Ophthalmol.*, 64: 766-769 (1980).

Conti, B., Bucolo, C., Giannavola, C., Puglisi, G., Giunchedi, P. y Conte, U. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: *in vitro/in vivo* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 5: 287-293 (1997).

Culbertson, W.W., Blumenkranz, M.S., Haines, H., Pepose, J.S., Stewart, J.A., y Curtin, V.T. The acute retinal necrosis syndrome. Histopathology and etiology. *Ophthalmology*, 89: 1317-1324 (1982).

Cutright, D.E., Pérez, B., Beasley, J.D., Larson, W.J. y Posey, W.R. Degradation of poly (lactic acid) polymer and co-polymers of poly (glycolic acid). *Oral Surg.*, 37: 142-152 (1974).

Davies, N.M., Farr, J., Hadgraft, J. y Kellaway, I.W. Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Pharm. Res.*, 8: 1039-1043 (1991).

Deshpande, S.G. y Shirolkar, S. Sustained release ophthalmic formulations of pilocarpine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41: 197-200 (1998).

Dharma, S.K., Fishman, P.H. y Peyman, G.A. A preliminary study of corneal penetration of 125-labeled idoxuridine liposome. *Acta Ophthalmol.*, 64: 298-301 (1986).

Dilova, V. y Shishova, V. Albumin microspheres as a drug delivery system for dexamethasone: pharmaceutical and pharmacokinetic aspects. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 987-989 (1993).

Donbrow, M. y Friedman, M. Enhancement of permeability of ethylcellulose films for drug penetration. *J. Pharm. Pharmacol.*, 27: 633-646 (1975).

Dressman, J.B. y Lennernäs, H. Oral drug absorption: Prediction and assessment. Marcel Dekker, Inc. New York, 173 (2000).

Egbaria, K. y Friedman, M. Release profiles of metronidazole and l-phenylalanine from individual albumin microspheres. *J. Control. Release*, 14: 215-220 (1990).

Elion, G.B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.*, 73: 7-13 (1982).

Faisant, N., Siepmann, J., Oury, P., Laffineur, V., Bruna, E., Haffner, J., y Benoit, J.P. The effect of gamma-irradiation on drug release from bioerodible microparticles: a quantitative treatment. *Int. J. Pharm.*, 242: 281-284 (2002).

Finch, C.A. Polymers for microcapsule walls. *Chem. Ind.*, 22: 752-756 (1985).

Fletcher, C.V. Treatment of herpesvirus infections in HIV-infected individuals. *Ann. Pharmacother.*, 26: 955-962 (1992).

Fresta, M., Panico, A.M., Bucolo, C., Giannavola, C. y Puglisi, G. Characterisation and in vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 565-576 (1999).

García-Encina, G., Seijo, B., Vila-Jato, J.L. y Torres, D. Microcápsulas en tecnología farmacéutica. *Ind. Farm.*, Mayo-Junio: 33-42 (1993).

Geigy Scientific Tables, Vol. 1. 8ª edición. Lentner, C. (ed.), Ciba-Geigy Limited, Basel, 178-180 (1980).

Genta, I., Conti, B., Perugini, P., Pavanetto, F., Spadaro, A. y Puglisi, G. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49: 737-742 (1997).

Geroski, D.H. y Edelhauser, H.F. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 961-964 (2000).

Gilding, D.K. y Reed, A.M. Biodegradable polymers for use in surgery - poly (glycolic)/poly (lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymer*, 20: 1459-1484 (1979).

Giordano, G.G., Refojo, M.F. y Arroyo, M.H. Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34: 2743-2751 (1993).

Gotti, R., Furlanetto, S., Andrisano, V., Cavrini, V. y Pinzauti, S. Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulphate. *J. Chromatogr. A*, 875: 411-422 (2000).

Gurny, R., Riser, J.E., Tabatabay, G., Martenet, M., Edman, P. y Camber, O. Precorneal residence time in humans of sodium hyaluronate as measured by gamma-scintigraphy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 228: 510-512 (1990).

Gürsel, I. y Hasirci, V. Properties and drug release behaviour of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate) copolymer microcapsules. *J. Microencapsul.*, 12: 185-193 (1995).

Harding, S.P. y Porter, S.M. Oral acyclovir in herpes zoster ophthalmicus. *Curr. Eye Res.*, 10: 177-182 (1991).

Hashida, M., Takahashi, Y., Muranishi, S. y Sezaki, H. An application of water in oil and gelatin microsphere-in-oil emulsion to specific delivery of anticancer agents in stomach lymphatics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 5: 241-255 (1977).

Herrero-Vanrell, R., Barcia E., Negro, S. y Refojo, M.F. Development of ganciclovir microspheres from poly (D,L-lactic-co-glycolide) acid for the treatment of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 8: 237-240 (1998).

Herrero-Vanrell, R., Fernández-Carballido, A., Frutos, G. y Cadórniga, R. Enhancement of the mydriatic response of tropicamide by bioadhesive polymers. *J. Ocular Pharm. Therapeutic.*, 16: 419-428 (2000).

Herrero-Vanrell, R., Ramirez, L., Fernández-Carballido, A. y Refojo M.F. Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. *Pharm. Res.*, 17: 1323-1328 (2000).

Herrero-Vanrell, R. y Refojo, M.F. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 52: 5-16 (2001).

Hughes, P.M., Krishnamoorthy, R. y Mitra A.K. Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdialysis technique. *J. Ocul. Pharm. Ther.*, 12: 209-224 (1996).

Hwang, Y.S. y Spruance, S.L. The epidemiology of uncommon herpes simplex virus type 1 infections. *Herpes*, 6: 16-19 (1999).

Izumikawa, S., Yoshiok, S., Aso, Y. y Takeda, Y. Preparation of poly (L-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *J. Control. Release*, 15: 133-140 (1991).

Jaffe, G.J., Yang, C.H., Guo, H., Denny, J.P., Lima, C. y Ashton, P. Safety and pharmacokinetics of an intraocular fluocinolone acetonide sustained delivery device. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 3569-3575 (2000).

Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (DL lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *J. Microencapsul.*, 7: 357-374 (1990a).

Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (DL lactic acid) II: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J. Microencapsul.*, 7: 260-269 (1990b).

Jalil, R. y Nixon, J.R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly (lactic-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. *J. Microencapsul.*, 7: 297-327 (1990c).

Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (DL lactic acid) I: Effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J. Microencapsul.*, 7: 255-259 (1990d).

Jalil, R. y Nixon, J.R. Microencapsulation using poly (L lactic acid) II: Effect of preparative variables affecting microcapsule properties. *J. Microencapsul.*, 7: 25-39 (1990e).

Jeffery, H., Davis, S.S. y O'Hagan, D.T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. *Pharm. Res.*, 10: 362-368 (1993).

Jones, B.R., Coster, D.J., Fison, P.N., Thompson, G.M., Cobo, L.M. y Falcon, M.G. Efficacy of acycloguanosine (Wellcome 248U) against herpes simplex corneal ulcers. *Lancet*, i: 243-244 (1979).

Keeney, R.E., Kirk, L.E. y Brigden, D. Acyclovir tolerance in humans. *Am. J. Med.*, 73: 176-181 (1982).

Khoobehi, B., Stradtman, M.O., Peyman, G.A. y Aly, O.M. Clearance of sodium fluorescein incorporated into microspheres from the vitreous after intravitreal injection. *Ophthalmic. Surg.*, 22: 175-180 (1991).

Khoobehi, B., Stradtman, M.O., Peyman, G.A. y Aly, O.M. Clearance of fluorescein incorporated into microspheres from the cornea and aqueous humor after subconjunctival injection. *Ophthalmic. Surg.*, 21: 840-844 (1991).

Kitagawa, K., Fukuda, M. y Sasaki, K. Intraocular penetration of topically administered acyclovir. *Lens Eye Toxic. Res.*, 6: 365-373 (1989).

Klein, R.J., Friedman-Kien, A.E. y DeStefano, E. Effect of discontinuous acyclovir treatment on the in vitro reactivation of herpes simplex virus from latently infected trigeminal ganglia. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 24: 129-131 (1983).

Koliopoulos, J. Acyclovir – a promising antiviral agent: a review of the preclinical and clinical data in ocular herpes simplex management. *Ann. Ophthalmol.*, 16: 19-24 (1984).

Kompella, U.B., Bandi, N. y Ayalaomayajula, S.P. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 1192-1201 (2003).

Kreuter, J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: preparation methods. *Pharm. Acta Helv.*, 58: 217-226 (1983).

Kuppermann, B.D., Quiceno, J.I., Wiley, C., Hesselink, J., Hamilton, R., Keefe, K., García, R. y Freeman, W.R. Clinical and histopathologic study of

varicella zoster virus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol.*, 118: 589-600 (1994).

La Lau, C., Oosterhuis, J., Versteeg, J., Van Rij, G., Renardel de Lavalette, J.G.C., Craandijk, A. y Lamers, W.P.M.A. Acyclovir and trifluoro thymidine in herpetic keratitis: a multicentre trial. *Br. J. Ophthalmol.*, 89: 1195-1200 (1982).

Langer, R. New methods of drug delivery. *Science*, 249: 1527-1533 (1990).

Law, S.L., Huang, K.J. y Chiang, C.H. Acyclovir containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J. Control. Release*, 63: 135-140 (2000).

Lee, V.H. y Bundgaard, H. Improved ocular drug delivery with prodrugs. *Prodrugs. Topical and ocular drug delivery*. Sloan, K.B. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 238-262 (1992).

Lee, V.H.L. y Robinson, J.R. Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. *J. Pharm. Sci.*, 68: 673-684 (1979).

Lee, V.H.L., Urrea, T., Smith, R.E. y Schanzlin, D.J. Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. *Surv. Ophthalmol.*, 29: 335-348 (1985).

Leelarasamee N., Howard, S.A., Malanga, C., Luzzi, L., Hogan, F., Kandzari, S. y Ma, K. Kinetics of drug release from polylactic acid hydrocortisone microcapsules. *J. Microencapsul.*, 3: 171-179 (1986).

Leelarasamee, N. y Ma, K. Effect of surface active agents on drug release from polylactic acid hydrocortisone microcapsules. *J. Microencapsul.*, 5: 37-46 (1988).

Lemaire, V., Bélair, J. y Hildgen, P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.*, 258: 95-107 (2003).

Leucuta, S.E. The kinetics of in vitro release and the pharmacokinetics of miotic response in rabbits of gelatin and albumin microspheres with pilocarpine. *Int. J. Pharm.*, 54: 71-78 (1989).

Losa, C., Marchal-Heussler, L., Orallo, F., Vila-Jato, J.L. y Alonso, M.J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metaprolol. *Pharm. Res.*, 10: 80-87 (1993).

Ludwig, A. y Van Ooteghem, M. The evaluation of viscous ophthalmic vehicles by slit lamp fluorophotometry in humans. *Int. J. Pharm.*, 54: 95-102 (1989).

Makino, K., Arakawa, M. y Kondo, T. Preparation and in vitro degradation properties of poly (lactide) microspheres. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 1195-1201 (1985).

Maulding, H.V. Prolonged delivery of peptides by microcapsules. *J. Control. Release*, 6: 167-176 (1987).

McCarron, P.A., Woolfson, A.D y Keating, S.M. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 193: 37-47 (1999).

McGhee, C.N.J., Pharmacokinetics of ophthalmic corticosteroids. *Br. J. Ophthalmol.*, 76: 681-684 (1992).

McGill, J. Herpes zoster ocular infection. *Scan. J. Infect. Dis.*, 47 (suppl.): 85-88 (1985).

Menei, P., Daniel, V., Montero-Menei, C., Brouillard, M., Pouplard-Barthelaix, A. y Benoit, J.P. Biodegradation and brain tissue reaction to poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials*, 14: 470-478 (1993).

Menei, P., Venier, M-C., Gamelin, E., Saint-André, J-P., Hayek, G., Fournier, D., Mercier, P., Guy, G. y Benoit, J.P. Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma. *Cancer*, 86: 325-330 (1999).

Meyers, J.D. Treatment of herpesvirus infections in the immunocompromised host. *Scan. J. Infect. Dis.*, 47 (suppl.): 128-136 (1985).

Meyers, S.M. y Rodriguez, M.M. Effect of selected intravitreal drugs after severe penetrating injury in rabbits. *Curr. Eye Res.*, 1: 471-477 (1981).

Miller, S.C. y Donovan, M.D. Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 12: 147-152 (1982).

Morimoto, Y., Sugibayashi, K. y Kato, Y. Drug carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. V: antitumor effect of microspheres entrapped adriamycin on liver metastasis of AH 7974 cells in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, 29: 1433-1438 (1981).

Moritera, T., Ogura, Y., Honda, Y. y Wada, R. Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32: 1785-1790 (1991).

Moritera, T., Ogura, Y., Yoshimura, N., Honda, Y., Wada, R., Hyon, S.H. y Ikada, Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 1325-1330 (1992).

Morley, M.G., Duker, J.S., Ashton, P. y Robinson, M.R. Replacing ganciclovir implants. *Ophthalmology*, 102: 388-392 (1995).

Motycka, M. y Nairn, J.C. Preparation and evaluation of microencapsulated ion-exchange resin beads. *J. Pharm. Sci.*, 68: 211-215 (1979).

Musch, D.C., Martin, D.F., Gordon, J.F., Davis, M.D. y Kuppermann, B.D. Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained-release ganciclovir implant. *N. Engl. J. Med.*, 337: 83-90 (1997).

Nack, H. Microencapsulation techniques. Application and problems. *J. Soc. Cosmetic Chemists*, 21: 85-98 (1970).

Naesens, L. y De Clercq, E. Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes*, 8: 12-16 (2001).

Negro, S. y Fernández-Carballido, A.M. Intravitreal administration of antiviral agents: repeated injections or implants?. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, 78: 647-648 (2003).

Nixon, J.R. y Walker, S.E. The in vitro evaluation of gelatin coacervate microcapsules. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23 (suppl.): 147 (1971).

Norley, S.G., Sendele, D., Huang, L. y Rouse, B.T. Inhibition of herpes simplex virus replication in the mouse cornea by drug containing immunoliposomes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28: 591-595 (1987).

O'Brien, J.J. y Campoli-Richards, D.M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 37: 233-309 (1989).

Ogawa, Y., Okada, H., Heya, T. y Skimamoto, T. Controlled release of LHRH agonist, leuprolide acetate from microspheres: serum drug level profiles and pharmacological effects in animals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41: 439-444 (1989).

Ohya, Y., Takey, T., Kobayashi, H. y Ouchi, T. Release behaviour of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition. *J. Microencapsul.*, 10: 1-9 (1993).

Okabe, J., Kimura, H., Kunou, N., Kato, A. y Ogura, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 4: 740-744 (2003).

O'Neil, M.J., Smith, A. y Heckleman, P.E. The Merck Index, 13ª edición. Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, 28 (2001).

Oosterhuis, J.A., Versteeg, J., Kruit, P.J. y Postma, B.H. Aciclovir treatment in experimental herpetic keratitis in rabbits. *Ophthalmic. Res.*, 12: 38-44 (1980).

Parfitt, K., Sweetman, S.C., Blake, P.S. y Parsons, B.H. Martindale, 32ª edición. The Royal Pharmaceutical Press, London, 602-606 (1999).

Park, S.S., Samly, N., Ruoff, K., D'Amico, D.J. y Baker, A.S. Effect of intravitreal dexamethasone in treatment of pneumococcal endophthalmitis in rabbits. *Arch. Ophthalmol.*, 113: 1324-1329 (1995).

Park, T.G. Degradation of poly (DL-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J. Control. Release*, 30: 161-173 (1994).

Péan, J.M., Boury, F., Venier-Julienne, M.C., Menei, P., Proust, J.E. y Benoit, J.P. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?. *Pharm. Res.*, 16: 1294-1299 (1999).

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W. y Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50: 27-46 (2000).

Petrovich, M., Ferreira, M., Alfaro, V., Lee, M., Trousdale, M. y Liggett, P. Intravitreal acyclovir clearance in rabbits with experimentally induced herpes simplex virus retinitis. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 180: 727 (1992).

Peyman, G.A. Clearance of microsphere-entrapped 5-fluorouracil and cytosine arabinoside from the vitreous of primates. *Int. Ophthalmol.*, 16: 109-113 (1992).

Peyman, G.A., Charles, H.C., Liu, K.R., Khoobehi, B. y Niesman, M. Intravitreal liposome-encapsulated drugs: A preliminary human report. *Int. Ophthalmol.*, 12: 175-182 (1988).

Peyman, G.A. y Schulman, A. Intravitreal drug therapy. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 33: 392-404 (1989).

Physicians' Desk Reference. 55ª edición. Medical Economics Company Inc., Montvale, 1510-1515 (2001).

Poirier, R.H., Kingdorm, J.D., de Miranda, P. y Annel, M. Intraocular antiviral penetration. *Arch. Ophthalmol.*, 100: 1964-1967 (1982).

Pongpaibul, Y., Maruyame, K. y Iwatsuru, M. Formation and in vitro evaluation of theophylline-loaded poly (methyl methacrylate) microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 530-533 (1988).

Pulido, J.S., Palacio, M., Peyman, G.A., Fiscella, R., Greenberg, D. y Stelmack, T. Toxicity of intravitreal antiviral drugs. *Ophthalm. Surg.*, 15: 666-669 (1984).

Ramirez, L., Pastoriza, P. y Herrero-Vanrell, R. Biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing tetracaine hydrochloride. In vitro release profile. *J. Microencapsul.*, 16: 105-115 (1999).

Refojo, M.F. y Herrero-Vanrell, R. Sustained delivery of ganciclovir from biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres. *ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale Florida*, 2743 (1996).

Reux, I., Fillet, A.M., Agut, H., Katlama, C., Hauw, J.J. y LeHoang, P. In situ detection of human herpes virus 6 in retinitis associated with AIDS. *Am. J. Ophthalmol.*, 114: 375-376 (1992).

Roizman, B. y Whitley, R.J. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes*, 8: 23-27 (2001).

Ross, M.L., Yuan, P. y Robinson, M.R. Intraocular drug delivery implants. *Rev. Ophthalmol.*, 95-99 (2000).

Rozier, A., Mazuel, C., Grove, J. y Plazonnet, B. Gelrite: A novel, ion-activated, in situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect of bioavailability of timolol. *Int. J. Pharm.*, 57: 163-168 (1989).

Rubin, A.L., Stenzel, K.H., Miyata, T., White, M.J. y Dunn, M. Collagen as a vehicle for drug delivery. *J. Clin. Pharmacol.*, 13: 309-312 (1973).

Sado, K., Kimura, T., Hotta, Y., Sakuma, H., Hayakawa, M.K.K. y Kanai, A. Acute retinal necrosis syndrome associated with herpes simplex keratitis. *Retina*, 14: 260-263 (1994).

Saettone, M.F., Chenoti, P., Torracca, M.T., Burgalassi, S. y Giannaccini, B. Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *Int. J. Pharm.*, 51: 203-212 (1989).

Samuelov, Y., Donbrow, M. y Friedman, M. Sustained-release of drugs from ethylcellulose poly ethylene glycol films and kinetics of drugs release. *J. Pharm. Sci.*, 68: 325-329 (1979).

Sanborn, G.E., Anand, R., Torti, R.E., Nightingale, S.D., Cal, S.X., Yates, B., Ashton, P. y Smith, T.J. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. *Arch. Ophthalmol.*, 110: 188-195 (1992).

Sanders, L.M., Kent, J.S., McRae, G.I., Wickery, B.H., Tice, T.R. y Lewis, D.H. Controlled release of leutinizing hormone-releasing hormone analogue from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 73: 1294-1297 (1984).

Sansdrap, P. y Möes, A.J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.*, 98: 157-164 (1993).

Sansdrap, P. y Möes, A.J. In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, 43: 47-58 (1997).

Sansdrap, P. y Möes, A.J. Influence of additives on the release profile of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Microencapsul.*, 15: 545-553 (1998).

Sarraf, D. y Lee, D.A. The role of iontophoresis in ocular drug delivery. *J. Ocular Pharmacol.*, 10: 69-81 (1994).

Schaeffer, H.E. y Krohn, D.L. Liposomes in topical drug delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 22: 220-227 (1982).

Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. y Collins, P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, 272: 583-585 (1978).

Schulman, J., Peyman, G.A., Fiscella, R., Greenberg, D., Horton, M.B. y de Miranda, P. Intraocular acyclovir levels after subconjunctival and topical administration. *Br. J. Ophthalmol.*, 70: 138-140 (1986).

Schulman, J., Peyman, G.A., Liu, J., Scott, M. y Barber, J.C. The intraocular penetration of acyclovir after subconjunctival administration. *Ophthalmic. Surg.*, 18: 111-114 (1987).

Shah, S.S., Cha, Y. y Pitt, C.G. Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?. *J. Control. Release*, 18: 261-270 (1992).

Sintzel, M., Bernatchez, S., Tabatabay, C. y Gurny, R. Biomaterials in ophthalmic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42: 358-374 (1996).

Sintzel, M.B., Merkli, A., Tabatabay, C. y Gurny, R. Influence of irradiation sterilization on polymers used as a drug carriers - a review. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23: 857-879 (1997).

Sjostrom, B., Bergenstahl, B. y Kronberg, B. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in-water emulsions. II: Influence of the emulsifier, the solvent and the drug substance. *J. Pharm. Sci.*, 82: 584-589 (1993).

Small, G.H., Peyman, G.A., Srinivasan, A., Smith, T.S. y Fiscella, R. Retinal toxicity of combination antiviral drugs in an animal model. *Can. J. Ophthalmol.*, 22: 300-303 (1987).

Smolin, G., Okumoto, M., Feiler, S. y Condon, D. Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 91: 220-225 (1981).

Spenlehauer, G., Vert, M.M., Benoît, J.P., Chabot, F. y Veillard, M. Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics. *J. Control. Release*, 7: 217-229 (1988).

Stratford, H.E., Yang, D.C., Redell, M.A. y Lee, V.H.L. Ocular distribution of liposome-encapsulated epinephrine and inulin in the albino rabbit. *Curr. Eye Res.*, 2: 377-386 (1982).

Tall, A.R., Hogan, V., Askinazi, L. y Small, D.M. Interaction of plasma high-density lipoproteins with dimyristoyllecithin multilamellar liposomes. *Biochemistry*, 17: 322-326 (1978).

Tano, Y., Sugita, G. y Abrams, G. Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am. J. Ophthalmol.*, 89: 131-136 (1980).

Teich, S.A., Cheung, T.W. y Friedman, A.H. Systemic antiviral drugs used in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*, 37: 19-53 (1992).

Tice, T.R. y Gilley, R.M. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process. *J. Control. Release*, 2: 343-352 (1985).

Tice, T.R., Mason, D.W. y Gilley, R.M. Clinical use and future of parenteral microsphere delivery systems. *Novel Drug Delivery*. Prescott, L.F. y Nimmo, W.S. (ed.), New York, 223-235 (1989).

Tous, S.S. y Abd-El Nasser, K. Acetazolamide topical formulation and ocular effect. *S.T.P. Pharma Sci.*, 2: 125-131 (1992).

Uchida, T., Yoshida, K. y Goto, S. Preparation and characterization of polylactic acid microspheres containing water-soluble dyes using a novel w/o/w emulsion solvent evaporation method. *J. Microencapsul.*, 13: 219-228 (1996).

Unlu, N., Ludwig, A., Van Oosteghem, M. y Hincal, A. Formulation of Carbopol 940 ophthalmic vehicles and in vitro evaluation of the influence of simulated lachrymal fluid on their physicochemical properties. *Pharmazie*, 46: 748-788 (1991).

Urayama, A., Yamada, N., Sasaki, T., Mishiya, Y., Watanabe, H. y Wakusawa, S. Unilateral acute anterior uveitis with periarteritis and detachment. *Jpn. J. Clin. Ophthalmol.*, 25: 607-619 (1971).

Urry, D.W. Bioelastic materials as chemomechanically transducing ("smart") matrices for drug delivery. *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers*. Cheng, T., Gebelein, C.G. y Yang, V.C. (ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Ann Arbor, 181-192 (1992).

Urtti, A. Delivery of antiglaucoma drugs: Ocular vs systemic absorption. *J. Ocular Pharmacol.*, 10: 349-357 (1994).

Vaughan, D., Asbury, T. y Riordan-Eva, P. Anatomía y embriología del ojo. *Oftalmología General*, 13ª edición. Manual Moderno, México D.F., 1-25 (1994).

Velez, G. y Whitcup, S.M. New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 83: 1225-1229 (1999).

Veloso, A.A., Zhu, Q., Herrero-Vanrell, R. y Refojo, M.F. Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 665-675 (1997).

Widder, K., Flouret, G. y Senyei, A. Magnetic microspheres: synthesis of a novel parenteral drug carrier. *J. Pharm. Sci.*, 68: 79-82 (1979).

Wilhelmus, K.R., Coster, D.J. y Jones, B.R. Acyclovir and debridement in the treatment of ulcerative herpetic keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 91: 323-327 (1981).

Willmot, N., Cummings, J. y Florence, A.T. In vitro release of adriamycin from drug loaded albumin and haemoglobin microspheres. *J. Microencapsul.*, 2: 293-304 (1985).

Witschi, C. y Doelker, E. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly (lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J. Control. Release*, 51: 327-341 (1998).

Wood, R.W., Lee, V.H.L., Kreuter, J. y Robinson, J.R. Ocular disposition of poly-hexyl-2-cyano(3-14C) acrylate nanoparticles in the albino rabbit. *Int. J. Pharm.*, 23: 175-183 (1985).

Yang, J. y Cleland, J.L. Factors affecting the *in vitro* release of recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ) from PLGA microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 86: 908-914 (1997).

Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y. y Ogura, Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 52: 25-36 (2001).

Young, B.J., Patterson, A. y Ravenscroft, T. A randomised double-blind clinical trial of acyclovir (Zovirax) and adenine arabinoside in herpes simplex corneal ulceration. *Br. J. Ophthalmol.*, 66: 361-363 (1982).